

Université de Montréal

**Dégradation des membres de la famille du LDLR
par la convertase PCSK9:
Troisième locus de l'hypercholestérolémie familiale**

par

Steve Poirier

Programmes de biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiæ Doctor (Ph.D.)*
en biologie moléculaire

Décembre, 2010

© Steve Poirier, 2010

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

**Dégradation des membres de la famille du LDLR
par la convertase PCSK9:
Troisième locus de l'hypercholestérolémie familiale**

présentée par :
Steve Poirier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Trang Hoang, présidente-rapporteuse
Dr Nabil G. Seidah, directeur de recherche
Dr Yves Marcel, membre du jury
Dre Katherine Cianflone, examinatrice externe
Dr Sébastien Carréno, représentant du doyen de la Faculté de Médecine

Résumé

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont les principales causes de mortalité et de morbidité à travers le monde. En Amérique du Nord, on estime à 90 millions le nombre d'individus ayant une ou plusieurs MCV, à près de 1 million le nombre de décès reliés par année et à 525 milliards de dollars les coûts directs et indirects en 2010. En collaboration avec l'équipe du Dre. Boileau, notre laboratoire a récemment identifié, le troisième locus impliqué dans l'hypercholestérolémie familiale. Une étude publiée dans le *New Engl J Med* a révélé que l'absence de la convertase PCSK9 réduit de 88% le risque de MCV, corrélé à une forte réduction du taux de cholestérol plasmatique (LDL-C). Il fut démontré que PCSK9 lie directement le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLR) et, par un mécanisme méconnu, favorise sa dégradation dans les endosomes/lysosomes provoquant ainsi une accumulation des particules LDL-C dans le plasma.

Dans cet ouvrage, nous nous sommes intéressés à trois aspects bien distincts : [1] Quels sont les cibles de PCSK9 ? [2] Quelle voie du trafic cellulaire est impliquée dans la dégradation du LDLR par PCSK9 ? [3] Comment peut-on inhiber la fonction de PCSK9 ?

[1] Nous avons démontré que PCSK9 induit la dégradation du LDLR de même que les récepteurs ApoER2 et VLDLR. Ces deux membres de la famille du LDLR (fortes homologies) sont impliqués notamment dans le métabolisme des lipides et de la mise en place de structures neuronales. De plus, nous avons remarqué que la présence de ces récepteurs favorise l'attachement cellulaire de PCSK9 et ce, indépendamment de la présence du LDLR. Cette étude a ouvert pour la première fois le spectre d'action de PCSK9 sur d'autres protéines membranaires.

[2] PCSK9 étant une protéine de la voie sécrétoire, nous avons ensuite évalué l'apport des différentes voies du trafic cellulaire, soit extra- ou intracellulaire, impliquées dans la dégradation du LDLR. À l'aide de milieux conditionnés dérivés d'hépatocytes primaires, nous avons d'abord démontré que le niveau extracellulaire de PCSK9 endogène n'a pas une grande influence sur la dégradation intracellulaire du LDLR, lorsqu'incubés sur des hépatocytes provenant de souris déficientes en PCSK9 (*Pcsk9*^{-/-}). Par analyses de tri

cellulaire (FACS), nous avons ensuite remarqué que la surexpression de PCSK9 diminue localement les niveaux de LDLR avec peu d'effet sur les cellules voisines. Lorsque nous avons bloqué l'endocytose du LDLR dans les cellules HepG2 (lignée de cellules hépatiques pour l'étude endogène de PCSK9), nous n'avons dénoté aucun changement des niveaux protéiques du récepteur. Par contre, nous avons pu démontrer que PCSK9 favorise la dégradation du LDLR par l'intermédiaire d'une voie intracellulaire. En effet l'interruption du trafic vésiculaire entre le réseau *trans*-Golgien (RTG) et les endosomes (interférence à l'ARN contre les chaînes légères de clathrine ; siCLCs) prévient la dégradation du LDLR de manière PCSK9-dépendante.

[3] Par immunobuvardage d'affinité, nous avons identifié que la protéine Annexine A2 (AnxA2) interagit spécifiquement avec le domaine C-terminal de PCSK9, important pour son action sur le LDLR. Plus spécifiquement, nous avons cartographié le domaine R1 (acides aminés 34 à 108) comme étant responsable de l'interaction PCSK9•AnxA2 qui, jusqu'à présent, n'avait aucune fonction propre. Finalement, nous avons démontré que l'ajout d'AnxA2 prévient la dégradation du LDLR induite par PCSK9.

En somme, nos travaux ont pu identifier que d'autres membres de la famille du LDLR, soit ApoER2 et VLDLR, sont sensibles à la présence de PCSK9. De plus, nous avons mis en évidence que l'intégrité du trafic intracellulaire est critique à l'action de PCSK9 sur le LDLR et ce, de manière endogène. Finalement, nous avons identifié l'Annexine A2 comme unique inhibiteur naturel pouvant interférer avec la dégradation du LDLR par PCSK9. Il est indéniable que PCSK9 soit une cible de premier choix pour contrer l'hypercholestérolémie afin de prévenir le développement de MCV. Cet ouvrage apporte donc des apports considérables dans notre compréhension des voies cellulaires impliquées, des cibles affectées et ouvre directement la porte à une approche thérapeutique à fort potentiel.

Mots-clés : Hypercholestérolémie, PCSK9, LDLR, ApoER2, VLDLR, convertase, trafic cellulaire, clathrine, inhibiteur, Annexine A2.

Abstract

Cardiovascular disease (CVD) is the primary cause of death and morbidity worldwide, claiming about 900 000 lives yearly in North America alone. A high level of circulating LDL-cholesterol is a major risk factor positively correlated with premature development of complex CVD mainly due to a rapid buildup of lipid deposition in the arteries. In collaboration with Dre Boileau, we recently discovered that the convertase PCSK9 is the third locus of familial hypercholesterolemia. A study published in the *New Eng J Med* revealed that the absence of PCSK9 reduces the risk of CVD by ~88%, resulting from a strong reduction of cholesterol in the bloodstream (LDL-C). It has been shown that PCSK9 directly binds the low-density lipoprotein receptor (LDLR) and by an unknown mechanism, reroutes it towards degradation in late endosomes/lysosomes, resulting in the accumulation of LDL-C particles in plasma.

In this thesis, we addressed three different aspects of PCSK9 biology: [1] What are the targets of PCSK9? [2] Which cellular trafficking components are involved in PCSK9-induced LDLR degradation? [3] How can we inhibit the function of PCSK9?

[1] We first demonstrated that PCSK9 induces the degradation of the LDLR and two of its closest family members. These include the very-low-density-lipoprotein receptor (VLDLR) and apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2) implicated in neuronal development and lipid metabolism. In addition, we demonstrated that these receptors enhance the cellular association of PCSK9 independently of the presence of the LDLR. This study represents the first evidence that PCSK9 could target other proteins for degradation, reinforcing its role as a key regulator of some members of the LDLR family.

[2] Since PCSK9 is a secreted protein, we decided to investigate the contributions of both the intra- and extracellular trafficking pathways in LDLR degradation. Using conditioned media derived from mice primary hepatocytes, we showed that endogenously secreted PCSK9 was not able to influence LDLR levels of PCSK9-deficient primary hepatocytes (*Pcsk9*^{-/-}). By flow cytometry (FACS), we observed that overexpression of the gain-of-function PCSK9-D374Y, but not wild type PCSK9, decreases cell surface LDLR

on adjacent cells suggesting that its spectrum of action is local. We also noticed that blockade of endocytosis in HepG2 cells (commonly used to study endogenous LDLR degradation by PCSK9) does not affect total LDLR protein levels. In contrast, disruption of the intracellular trafficking between the *trans*-Golgi network (TGN) and endosomes (siRNAs against clathrin light chains; CLCs) prevented LDLR degradation in a PCSK9-specific manner.

[3] By Far Western blotting, we identified that Annexin A2 (AnxA2) specifically interacts with the C-terminal domain of PCSK9, which is crucial for its function in LDLR degradation. Moreover, we determined that the R1 domain (amino acids 34 to 108) is responsible for the PCSK9•AnxA2 interaction, which confers a new function for this protein. Finally, we showed that addition of AnxA2 prevents PCSK9-induced LDLR degradation.

In summary, this work allowed us to identify that PCSK9 induces the degradation of the LDLR and its closest family members, ApoER2 and VLDLR. We also highlighted that the integrity of the intracellular trafficking pathway is crucial for endogenous PCSK9-induced LDLR degradation. Furthermore, we discovered that AnxA2 is a unique, natural inhibitor capable of interfering with the action of PCSK9 in LDLR degradation. It is undeniable that PCSK9 is a genetically validated target to reduce circulating LDL-cholesterol and prevent CVD. This thesis brings forth important contributions in our understanding of the cellular pathways involved and opens the door for novel therapeutic approaches.

Keywords : Hypercholesterolemia, PCSK9, LDLR, ApoER2, VLDLR, convertase, cellular trafficking, clathrin, inhibitors, Annexin A2.

Table des matières

Chapitre I: Introduction.....	1
1.1. L'étude de Framingham.....	1
1.2. Structure et synthèse du cholestérol	2
1.2.1 Inhibiteurs de la synthèse du cholestérol.....	4
1.3. Régulation des gènes cholestérogéniques.....	5
1.4. Lipoprotéines plasmatiques	9
1.4.1 Métabolisme des lipoprotéines.....	9
1.4.2 Éfflux lysosomal du cholestérol dérivé des LDL	12
1.4.3 Transport inverse du cholestérol	13
1.5. L'hypercholestérolémie familiale	14
1.5.1 Description clinique	14
1.5.2 Hypercholestérolémie autosomal dominante	14
1.5.3 Hypercholestérolémie autosomal récessive.....	15
1.5.4 PCSK9: Troisième locus	16
1.5.5 Modèles animaux pour PCSK9: effets sur le cholestérol.....	17
1.5.6 Recherche de nouveaux gènes candidats (GWAS)	18
1.6. PCSK9 : une convertase de proprotéines atypique	19
1.6.1 Survol des différentes classes de protéases	19
1.6.2 Structure et fonction des convertases de proprotéines	20
1.6.2.1 Découvertes et motifs de clivage	20
1.6.2.2 Domaines et mécanisme d'activation.....	21
1.6.2.3 Distribution tissulaire et localisation cellulaire.....	22
1.6.3 Régulation transcriptionnelle de PCSK9.....	24
1.6.3.1 Statines et facteurs cholestérogéniques	24
1.6.3.2 LXR et acides biliaires	25
1.6.3.3 Berbérine et HNF-1 α	25
1.6.3.4 Fibrates.....	26
1.6.4 PCSK9 et apoB100.....	27
1.6.5 Biochimie structurale de PCSK9.....	28

1.6.5.1 Synthèse, activation et catabolisme.....	28
1.6.5.2 Analyses cristallographiques.....	30
1.6.5.3 Modifications post-traductionnelles.....	31
1.7. PCSK9 : un passeport pour la dégradation du LDLR.....	32
1.7.1 Liaison de PCSK9 au LDLR.....	32
1.7.2 PCSK9 un inhibiteur naturel du LDLR.....	33
1.7.3 Contribution du trafic extra- versus intracellulaire.....	36
1.7.4 Stratégies d'inhibition de la PCSK9.....	38
Chapitre II: Article 1.....	40
<i>Titre : The Proprotein Convertase PCSK9 Induces the Degradation of Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) and Its Closest Family Members VLDLR and ApoER2.....</i>	40
Pertinence.....	40
2.1. INTRODUCTION.....	43
2.2. EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	44
2.3. RESULTS.....	47
2.4. DISCUSSION.....	55
2.5. FIGURE LEGENDS.....	58
2.6. REFERENCES.....	64
Chapitre III: Article 2.....	82
<i>Titre : Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: EVIDENCE FOR AN INTRACELLULAR ROUTE.....</i>	82
Pertinence.....	82
3.1. INTRODUCTION.....	85
3.2. EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	87
3.3. RESULTS.....	92
3.4. DISCUSSION.....	97
3.5. FIGURE LEGENDS.....	102
3.6. REFERENCES.....	107
Chapitre IV: Article 3.....	124
<i>Titre : Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels.....</i>	124

Pertinence	124
4.1. INTRODUCTION	127
4.2. EXPERIMENTAL PROCEDURES	129
4.3. RESULTS	134
4.4. DISCUSSION	140
4.5. FIGURE LEGENDS.....	145
4.6. REFERENCES	151
Chapitre V: Discussion	168
5.1 Rôles et cibles de PCSK9.....	168
5.1.1 Membres de la famille du LDLR	168
5.1.1.1 Fonctions biologiques	168
5.1.1.2 PCSK9 et dégradation du LDLR, ApoER2 et VLDLR.....	169
5.1.1.3 Liaison de PCSK9 au LDLR, ApoER2 et VLDLR.....	171
5.1.1.4 Analyses cristallographiques.....	172
5.1.1.5 Fusion de Lamp1 et PCSK9.....	177
5.1.1.6 Régulation <i>in vivo</i> des récepteurs par PCSK9.....	177
5.1.2 Le récepteur CD81 et le virus de l'hépatite C (VHC).....	180
5.1.3 Hépatectomie partielle et diabète	182
5.2 Voies du trafic cellulaire	183
5.2.1 Voie extracellulaire	184
5.2.2 Effet local de PCSK9 sur la dégradation du LDLR	186
5.2.3 Voie intracellulaire.....	187
5.2.4 PCSK9 et l'ubiquitination du LDLR.....	194
5.3 PCSK9 et Annexine A2 (AnxA2).....	196
5.3.1 Identification d'un inhibiteur naturel pour PCSK9	196
5.3.2 Cartographie de l'interaction PCSK9□AnxA2	197
5.4 Focus sur le domaine CHRD de PCSK9.....	202
Conclusion.....	204
Bibliographie	205
ANNEXE 1	xvii
ANNEXE 2	xviii

ANNEXE 3 xix
ANNEXE 4xx
ANNEXE 5 xxi
ANNEXE 6 xxii
CURRICULUM VITAE xxiii

Liste des tableaux

<u>Table 1</u> Propriétés physiques et compositions lipidiques et protéiques des lipoprotéines plasmatiques humaines.....	10
--	----

Liste des figures

<u>Figure 1</u> Structure et synthèse du cholestérol.....	3
<u>Figure 2</u> Inhibition de l'HMG-CoA reductase par les statines.....	5
<u>Figure 3</u> Cascade de régulation des gènes cholestérogéniques.....	7
<u>Figure 4</u> Métabolisme des lipoprotéines humaines.....	11
<u>Figure 5</u> Loci de l'hypercholestérolémie familial dominante (FH).....	18
<u>Figure 6</u> Structure de PCSK9.....	30
<u>Figure 7</u> PCSK9 induit la dégradation du LDLR.....	35
<u>Figure 8</u> PCSK9 induit la dégradation des récepteurs ApoER2 et VLDLR indépendamment de la nature de leurs queues cytosoliques.....	170
<u>Figure 9</u> Analyse comparative des séquences « EGF-A » des membres de la famille du LDLR.....	176
<u>Figure 10</u> Diminution des niveaux protéiques du VLDLR dans le cœur de souris surexprimant PCSK9 dans les hépatocytes.....	181
<u>Figure 11</u> Modèle des voies du trafic cellulaire (intra vs extra) impliquées dans l'induction de la dégradation du LDLR par PCSK9.....	185
<u>Figure 12</u> Corrélation entre l'atténuation génique des composants du trafic cellulaire et l'effet du chlorure d'ammonium sur les niveaux du LDLR.....	188
<u>Figure 13</u> Domaine d'interaction de l'anticorps mAb1 (portion Fab) à PCSK9.....	191
<u>Figure 14</u> PCSK9 n'affecte pas le taux d'ubiquitination du LDLR.....	195
<u>Figure 15</u> Superposition des structures Annexine A1 et A2.....	198
<u>Figure 16</u> Signature des résidus essentiels pour la liaison de PCSK9 à l'AnxA2.....	199
<u>Figure 17</u> Interrelation entre PCSK9 et les MCV.....	xvii
<u>Figure 18</u> Membres de la famille du LDLR.....	xviii
<u>Figure 19</u> Effet de PCSK9 sur la dégradation du LDLR dans le foie et les surrénales.....	xix
<u>Figure 20</u> Analyses des facteurs cholestérogéniques dans les souris déficientes pour la sortiline.....	xx
<u>Figure 21</u> Caractérisation des résidues importants dans la liaison de PCSK9 à l'Annexine A2.....	xxi
<u>Figure 22</u> Effet de la rétention du peptide R1 de l'AnxA2 dans le réticulum endoplasmique sur la sécrétion de PCSK9.....	xxii

*À Isâ, Albert, mes parents, beaux-parents et
amis(es) et nos petites merveilles à venir...*

Remerciements

Je tiens sincèrement à remercier le *Dr. Nabil G. Seidah* pour sa confiance, sa virtuosité, son amitié et sa passion contagieuse. Je garderai toujours un excellent souvenir de nos nombreuses discussions, souvent imprévues, sur la science et la vie en générale. Un énorme merci à mes collègues *Ahmed Zaid, Ann Chamberland, Anna Roubtsova Stepanova, Annik Prat, Brigitte Mary, David Langlais, Delia Susan-Resiga, Edwige Marcinkiewicz, Éric Bergeron, Estelle Rousselet, Gaétan Mayer, Geneviève Dubuc, Grisel Luna, Hanny Wassef, James Cromlish, Johann Guillemot, Josée Hamelin, Marie-Claude Asselin, Maxime Denis, Michel Trambly, Nasha Nassoury, Nidhi Gupta, Rachid Essalmani, Surendra Nimesh, Suzanne Benjannet, WooJin Kim, Xiaowei Sun, Zuhier Awan* et collaborateurs *Dominic Fillion, Éric Massicotte, Franck Duclos, Jean Davignon, Joanne Paquin, Johannes Nimpf, Frank Duclos, Martine Dupuis, Peter McPherson, Rex Parker, Robert Day et Yves Marcel* pour leurs savoirs, supports et pour avoir partagé de si bons moments.

Je suis aussi grandement reconnaissant pour les supports du département de biologie moléculaire de l'Université de Montréal, de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) et des Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC). Je tiens aussi à remercier chaleureusement les membres de mon comité de suivi ainsi que le jury d'avoir accepté l'invitation d'évaluer cette thèse.

Un énorme merci à mes parents, beaux-parents et amis(es) pour leurs conseils et encouragements, pour leurs folies et bonnes compagnies et avant tout de faire partie de ma vie. Merci aussi à *Vincent Larivière* pour les nombreuses et intéressantes discussions sur la science et ses mesures.

Une mention toute spéciale à *Isâ*, mon amour pour toujours, pour son intelligence, sa simplicité et sa bonne humeur. Merci d'être qui tu es, d'enseigner ma vie à travers notre brillante complicité et de partager si bien nos projets de famille dont le merveilleux Albert et nos futures petites virgules.

ANXA2 annexine A2
AP protéines adaptatrices
ApoER2 *apolipoprotein E2 receptor*
ARH *autosomal recessive hypercholesterolemia*
CLC *chaîne légère de clathrine*
CNS système nerveux central
EGF-AB *epidermal growth factor domain AB*
EGFP *enhanced green fluorescent protein*
ELISA *enzyme linked immunosorbent assay*
ET/L *endosomes tardifs/lysosomes*
FACS *fluorescence-activated cell sorting*
GGA *Golgi-localized, gamma-ear-containing, ARF-binding proteins*
HA hémagglutinine d'influenza
HDL *high-density lipoprotein*
HMGCR *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase*
KD *knock-down*
KO *knock-out*
LDL *low-density lipoprotein*
LDLR *low-density lipoprotein receptor*
LPDS *lipoprotein-deficient serum*
NARC-1 *neural apoptosis-regulated convertase 1*
PCSK9 *proprotein convertase subtilisin kexin 9*
RE réticulum endoplasmique
RTG réseau *trans*-golgien
siRNA *small interfering RNA*
SKI-1 *subtilisin kexin isoform-1*
SP *signal peptide*
SREBP *sterol regulatory element-binding proteins*

VLDLR *very low density lipoprotein receptor*

WT *wild-type*

Chapitre I: Introduction

Les maladies cardiovasculaires (MCV) et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont parmi les principales causes d'incapacité et de décès à travers le monde.¹ Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les MCV sont de plus en plus fréquentes dans les pays en développement relié notamment à l'accroissement de la longévité, de l'urbanisation et du changement des habitudes de vie. Les MCV sont aussi fonction de l'environnement et de l'influence socio-économique. En effet, le taux de MCV chez les Japonais immigrant aux États-Unis, qui sont dans les populations les moins à risque, rejoint celui des Américains.¹ Environ le tiers de la population Nord Américaine, soit 105 millions d'individus, aurait un taux trop élevé de mauvais cholestérol sanguin (LDL-cholestérol).^{1, 2} Lorsque ces particules s'accumulent dans la circulation, celles-ci pénètrent la paroi des vaisseaux pouvant mener à une pathologie nommée athérosclérose, définie par un rétrécissement des vaisseaux sanguins.³ Selon l'*American Heart Association (AHA)*, la Société canadienne de cardiologie (SCC) et la Fondation des Maladies du Cœur du Canada (FMCC), on estime à 90 millions le nombre d'individus ayant une ou plusieurs maladies cardiovasculaires, à 2400 le nombre de décès reliés par jour et à 525 milliards de dollars les coûts directs et indirects aux États-Unis et au Canada en 2010.^{2, 4, 5} De plus, l'OMS projette que les MCV seront toujours au premier rang mondial des causes de mortalité et de morbidité pour les deux prochaines décennies.⁶

1.1. L'étude de Framingham

En 1948, des chercheurs Américains ont entrepris une étude épidémiologique d'envergure afin d'identifier des facteurs (biomarqueurs) contributoires au développement de MCV, en fonction du temps.⁷ Il s'agissait de suivre une cohorte de 5209 individus, hommes et femmes, âgées entre 30 et 62 ans provenant d'une petite ville nommé Framingham dans l'état du Massachusetts aux États-Unis, qui ne présentaient aucun symptôme cardiovasculaire. Depuis, la *Framingham Heart Study* comporte plus de 14428 individus, établis sur trois générations, suivis régulièrement pour des examens sanguins et physiologiques.^{8, 9} Ces études ont permis de déterminer certains facteurs de risque selon

deux catégories: invariables et variables. Parmi les facteurs de risque invariables, on retrouve l'âge, le sexe ainsi que l'hérédité familiale. Le tabagisme, le cholestérol plasmatique, l'inactivité physique, la pression sanguine sont des facteurs dits modifiables.¹⁰ Récemment, plusieurs autres biomarqueurs furent identifiés: la protéine C réactive (CRP)¹¹, le peptide natriurétique de type B (BNP)¹², le fibrinogène¹³, l'homocystéine¹⁴ et la pollution atmosphérique¹⁵. L'identification de ces facteurs de risque représente une piste clinique de premier plan dans la prévention primaire (habitudes de vie) et secondaire (approches thérapeutiques) dans le but commun de prévenir le développement de maladies coronariennes.

1.2. Structure et synthèse du cholestérol

Afin de bien comprendre l'implication du cholestérol plasmatique dans le développement de MCV, il est important de décrire les différentes étapes de synthèse ainsi que la machinerie transcriptionnelle impliquée. En 1655, Robert Boyle, un philosophe et chimiste à qui l'on doit notamment la loi de Boyle-Mariotte sur la thermodynamique du gaz réel, avait corrélié que lors de la prise alimentaire, le sang présentait plutôt une apparence laiteuse. Ensuite, plusieurs chercheurs ont dénoté la présence d'une substance dure et grasse dans les calculs biliaires où le cholestérol fut extrait par Salkowski à l'aide d'acide sulfurique.¹⁶ En 1927 et 1928, Heinrich Wieland et Adolf Windaus ont reçu le prix Nobel de chimie pour leurs travaux sur les acides biliaires ainsi que pour l'élucidation de la structure du cholestérol tel que nous la connaissons aujourd'hui (Fig. 1a).¹⁷ Le cholestérol possède quatre cycles de carbones (noyau cyclo-pentano-phénanthrénique) ainsi qu'une chaîne de huit carbones. De plus, le carbone C3 a un groupement hydroxyle (-OH) qui lui confère un caractère amphipathique. Dans le réticulum endoplasmique, le cholestérol peut être estérifié par une enzyme nommée ACAT (acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransférase) ou par la LCAT (lecithin:cholesterol acyltransferase) dans le plasma. L'addition d'une chaîne de carbone à caractère hydrophobique sur le groupement hydroxyle du cholestérol permet aux esters de cholestérol d'être transporté dans la circulation sanguine

par diverses lipoprotéines.¹⁸ En 1910, Adolf Windaus observa qu'il y avait 20 fois plus d'esters de cholestérol dans la paroi artérielle contenant des athéromes (gonflement de la paroi des artères indicatif du développement d'athérosclérose).¹⁶ De plus, le cholestérol peut être catabolisé par différentes enzymes oxydantes de manière à le rendre plus hydrosoluble soit pour être excrété du foie ou pour servir d'émulsifiant lors de la prise alimentaire dans l'intestin.¹⁹

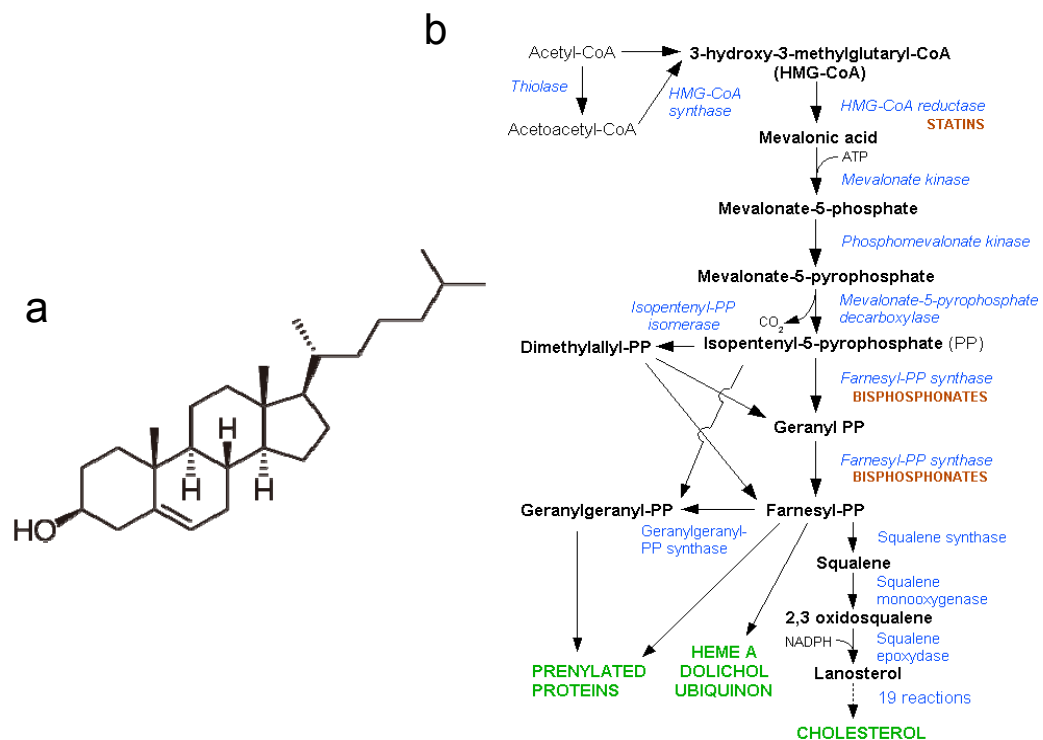


Figure 1 Structure et synthèse du cholestérol. (a) structure de cholestérol. **(b)** étape de synthèse du cholestérol et sous-produits à partir de la voie métabolique du mévalonate.

(Source: Wikipedia, Goldstein JL et coll.²⁰)

En 1964, les chercheurs Konrad Bloch et Feodor Lynen obtiennent le prix Nobel de physiologie et de médecine particulièrement pour l'étude des étapes de synthèse du cholestérol.^{17, 21, 22} Le cholestérol est synthétisé principalement par le foie et l'intestin à

partir de la voie métabolique du mévalonate (Fig. 1b).²⁰ D'abord, la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A synthase²³ (ou HMG-CoA synthase) catalyse la condensation de trois molécules d'acétate en 3-hydroxy-3-méthyl-glutarate (HMG) en présence de coenzyme A. L'HMG-CoA est ensuite réduit en mévalonate par la 3-hydroxy-3-méthyl-glutarate-CoA reductase²⁴ et décarboxylé en isoprénoïdes soit l'isopentényl pyrophosphate et le diméthylallyl pyrophosphate. La condensation de 6 molécules d'isoprénoïdes conduit finalement à la formation du squalène qui, à l'aide de la squalène cyclase, forme les cycles du cholestérol à partir d'insaturations présentes dans le squalène.²⁵ Outre le cholestérol, la voie métabolique du mévalonate génère aussi d'autres molécules telles les vitamines D, A, K₂, l'ubiquinone, les hormones stéroïdiennes (progestérone, testostérone, œstrogène, etc.), le cortisol et les isoprénoïdes. (Fig. 1b).²⁰

1.2.1 Inhibiteurs de la synthèse du cholestérol

L'action de l'HMG-CoA reductase est l'étape limitante dans la synthèse du cholestérol. Dans les années 70, le biochimiste japonais Akira Endo avait émis l'hypothèse que certains champignons synthétiseraient des molécules pouvant inhiber la synthèse endogène du cholestérol de certains organismes, en vue de fragiliser leurs parois cellulaires.²⁶ Ses travaux ont donc permis d'isoler et d'identifier quelques métabolites capables d'interférer avec cette enzyme clé de la synthèse du cholestérol qu'il nomma Mevastatine (ML-236).²⁷ Plusieurs géantes pharmaceutiques (Merck ; MevacorTM, Pfizer ; LipitorTM) ont depuis développées des dérivés de statines très efficaces et largement prescrites pour diminuer massivement le cholestérol plasmatique et ainsi réduire le nombre de MCV.²⁸ Il est important aussi de noter que très prochainement, en 2011, la plupart des brevets entourant les statines seront échus laissant place à une fabrication générique réduisant considérablement les coûts associés pour les patients.^{28, 29} Il fut récemment démontré que l'Atorvastatine (LipitorTM), modélisée à partir du site catalytique de l'HMG-CoA reductase (Fig. 2) avec un IC₅₀ de 8nM, réduisait la présence de plaques athéromateuses.^{30, 31} Selon l'étude ASTEROID, des résultats similaires ont été obtenus à

l'aide de la Rosuvastatine (AstraZeneca; Crestor™).³² Outre les statines, une autre façon de réduire la formation de cholestérol est d'inhiber la dernière enzyme de la cascade soit la squalène synthase³³, ce qui pourrait limiter les effets pléiotropiques connus des statines dû aux sous-produits du mévalonate.³⁴

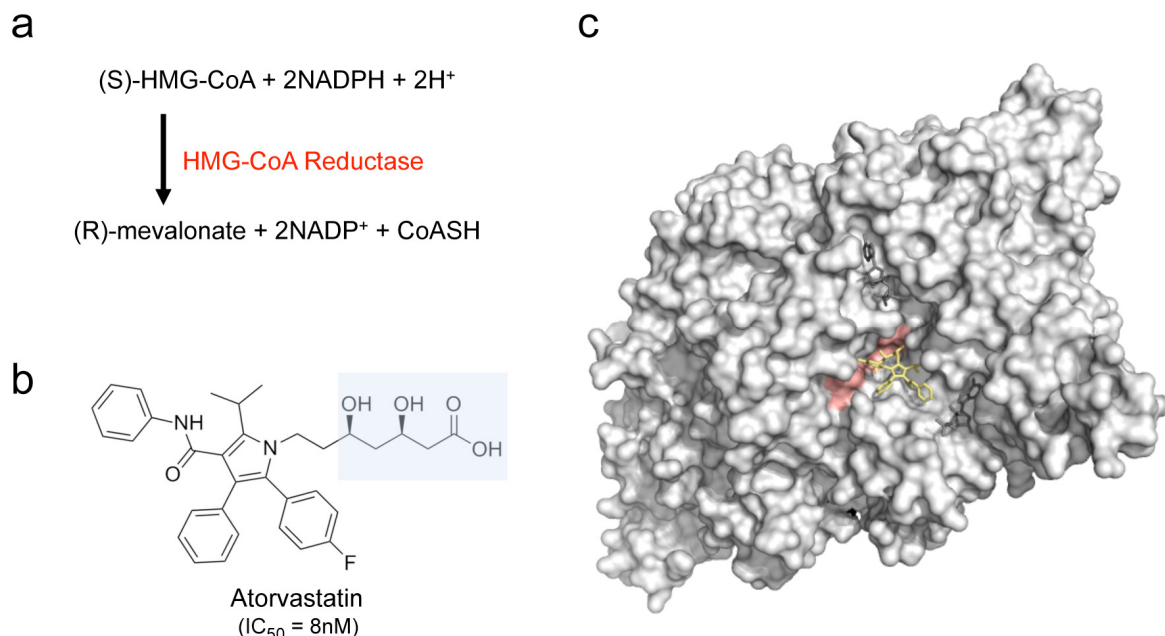


Figure 2 Inhibition de l'HMG-CoA reductase par les statines. (a) conversion du 3-hydroxy-3-méthyl-glutarate-CoA en mévalonate par l'HMG-CoA réductase. (b) structure de l'atorvastatine (IC₅₀ = 8nM); le mévalonate est représenté par l'encadré. (c) structure de l'HMG-CoA reductase déterminée à l'aide de MacPymol (gris, PDB 1HWK) complexée avec l'atorvastatine (jaune) et deux molécules de NADPH (gris foncé). La surface du domaine catalytique est illustrée en rose.³¹

1.3. Régulation des gènes cholestérogéniques

Le cholestérol joue un rôle important dans la fluidité de la membrane plasmique ainsi que dans la synthèse d'acides biliaires et d'hormones stéroïdiennes. La composition cellulaire et tissulaire en cholestérol requière une balance finement contrôlée dans l'organisme.³⁵ Les sources de cholestérol proviennent à 25% de l'alimentation (source

exogène; ~300-500 mg/jour) et 75% est synthétisé par divers tissus tels le foie, l'intestin et les surrénales (source endogène; ~700-900 mg/jour).³⁶ Pour maintenir l'homéostasie, ~685 mg/jour du cholestérol est éliminé par la voie gastro-intestinale et la peau et ~450 mg/jour est converti en acides biliaires et hormones stéroïdiennes pour être ensuite excrétés dans la bile et l'urine.³⁶ En 1933, Rudolf Schoenheimer avait remarqué que le cholestérol alimentaire (exogène) régulait de manière négative (boucle rétroactive) la synthèse endogène.^{20, 37} À l'inverse, en absence de stérols, la cellule possède un système finement régulé qui orchestre la *néo*-synthèse du cholestérol ainsi que la capture du cholestérol contenu dans les particules LDL (source exogène) par le LDL récepteur.²⁰ Récemment, les Nobels Joseph L. Goldstein et Michael S. Brown¹⁷, ont montré que cette balance entre l'activation ou l'inactivation de la *néo*-synthèse du cholestérol provient d'une délicate sensibilité du réticulum endoplasmique (RE) à une variation de 5% du cholestérol sur la composition lipidique membranaire.³⁸ Comment la cellule perçoit ces variations et parvient à induire la transcription des gènes cholestérogéniques ?

En 1987, Südhof et *coll.* ont identifié une séquence de 42 nucléotides dans la région régulatrice du gène codant pour le récepteur aux LDL (LDLR) qui est sensible au niveau de cholestérol cellulaire.³⁹ Cette région nommée *sterol regulatory element* (SRE) a conduit à l'identification d'une famille de facteurs de transcription soit les *sterol regulatory element binding protein* (SREBPs).^{40, 41} Les SREBPs font parties de la famille des *basic-helix-loop-helix leucine zipper* (bHLH-Zip) où leurs portions N-terminale chargées positivement est impliquées dans la reconnaissance directe à l'ADN (Fig. 3). Dans le réticulum endoplasmique (RE), les SREBPs sont sous forme précurseur (~120 kDa) et possèdent une structure en épingle à cheveux où les domaines N- et C-terminaux, orientés vers le cytosol, sont séparés par une boucle d'environ trente acides aminés présente dans la lumière du RE.⁴² Lorsque retrouvé dans le noyau, les domaines actifs (chargés positivement) des SREBPs (SREBP-2 et 1a) régulent à la hausse l'expression des gènes impliqués dans la synthèse enzymatique du cholestérol (Fig. 1b), le LDLR ainsi que PCSK9, qui sera discutée plus loin.⁴³⁻⁴⁵ Pour sa part, l'isoforme SREBP-1c régule l'expression des gènes engagés dans

la synthèse d'acides gras et de triglycérides.⁴³ Une percée importante dans la compréhension de la boucle rétroactive des SREBPs par le cholestérol provient de l'observation qu'en absence de cholestérol, le fragment N-terminal est libéré de son précurseur à l'aide de coupures séquentielles engendrées par la convertase SKI-1/S1P et la métalloprotéinase S2P.⁴⁶⁻⁵⁰ Ce relâchement du domaine transcriptionnellement actif, qui est ensuite transloqué au noyau, est l'amorce pour l'induction des gènes cholestérogéniques (Fig. 3). À l'inverse, en présence de stérols, la forme nucléaire de SREBP est absente causé par une abrogation de coupures par SKI-1/S1P et S2P.⁴⁰

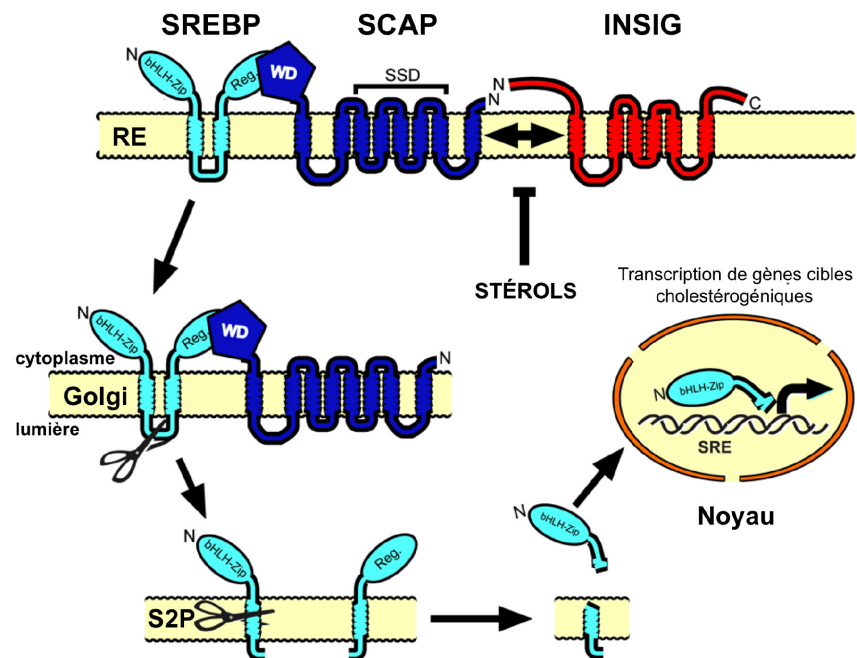


Figure 3 Cascade de régulation des gènes cholestérogéniques.

(Source: Modifiée de Wikipedia, Horton JD et coll.⁴³)

Il fut remarqué que certaines cellules étaient résistantes à la rétro-inhibition causée par le cholestérol. À l'aide d'un criblage d'ADN complémentaire, Hua *et coll.* ont pu identifier la protéine SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) comme étant directement corrélée avec la présence de la forme nucléaire des SREBPs (Fig. 3).^{51, 52} Une mutation

ponctuelle dans le locus de SCAP (D443N) fut associée à une augmentation considérable de l'activité des SREBPs (coupure et expression de gènes cholestérogéniques) et a pu expliquer la cause de l'absence de rétro-inhibition par le cholestérol dans ces cellules. Ces observations ont conféré à SCAP un rôle pivot à titre de sonde du cholestérol dans le foie.⁵³ Chez des souris génétiquement modifiées, l'absence de SCAP réduit de ~80% de la *néo*-synthèse du cholestérol et de lipides dû à une forte réduction des gènes cholestérogéniques en plus d'être insensible aux niveaux de cholestérol exogène.⁵⁴ Il fut d'abord observé que la surabondance de SCAP favorise le transport de SREBP vers le réseau *trans*-golgien (RTG), possiblement dû à un autre facteur qui serait saturé dans ces conditions. Ensuite est née l'hypothèse que ce facteur pourrait agir dans la rétention du complexe SCAP•SREBP dans le RE. Yang *et coll.* ont donc identifié la protéine Insig-1 (*insulin induced gene*) comme étant résidante du RE et interagissant directement avec SCAP. Ils ont aussi observé que la présence d'Insig prévient le transport du complexe SCAP•SREBP du RE vers le RTG (Fig. 3).⁵⁵ Par conséquent, la surabondance d'Insig-1 prévient donc l'activation de SREBP dans le RTG par les enzymes SKI-1/SIP et S2P, réduisant l'activation des gènes cholestérogéniques et ce, même en absence de cholestérol.

Depuis, le mécanisme par lequel le cholestérol exerce une boucle rétroactive sur sa synthèse endogène est bien documenté. Cette balance orchestrée par les facteurs de transcription SREBPs dépend directement de la présence de SCAP et d'Insig, qui agissent comme protéines régulatrices sensibles au cholestérol membranaire. Dans le RE, lorsque le cholestérol (en excès) se lie à SCAP, ceci provoque un changement de conformation prévenant ainsi l'incorporation du complexe SCAP•SREBP dans les vésicules COPII, impliquées dans le transport antérograde de protéines du RE vers le RTG.^{56, 57} De manière plus spécifique, lorsque la cellule est en présence de cholestérol, la séquence peptidique « MELADL » présente dans SCAP devient inaccessible au complexe COPII.⁵⁸ De plus, il y a formation du complexe Insig•SCAP•SREBP qui provoque une rétention dans le RE lors d'un excès de cholestérol.⁵⁹ À l'inverse, en absence de cholestérol, Insig se détache du complexe SCAP•SREBP, ce qui libère le peptide « MELADL » de SCAP, permet le

transport du complexe vers le RTG pour être ensuite coupé par SKI-1/S1P et S2P où la portion N-terminale de SREBP activera les gènes cholestérogéniques dans le noyau (Fig. 3).⁶⁰

1.4. Lipoprotéines plasmatiques

Les lipoprotéines sont des assemblages biochimiques amphipathiques de forme sphérique formées d'apolipoprotéines et de lipides. Elles ont comme principales fonctions de transporter des molécules hydrophobes tels le cholestérol, les esters de cholestérol, les triglycérides et les phospholipides dans l'environnement aqueux qu'est la circulation sanguine.⁶¹⁻⁶³ Bien que les lipoprotéines partagent essentiellement la même fonction, leurs origines et compositions protéiques leur confèrent des rôles bien distincts. On classe généralement les lipoprotéines en fonction de leurs densités soit par ordre croissant : Chylomicrons (CM) < VLDL (*very low density lipoprotein*, lipoprotéines de très basse densité) < IDL (*intermediate density lipoprotein*, lipoprotéines de densité intermédiaire) < LDL (*low density lipoprotein*, lipoprotéines de basse densité) < HDL (*high density lipoprotein*, lipoprotéines de haute densité). Les chylomicrons et les VLDL sont plutôt riches en triglycérides, les LDL en cholestérol et les HDL en cholestérol et phospholipides (*voir* Table 1). La densité des lipoprotéines est en étroite relation avec le pourcentage protéique de chacune d'entre elles (1% pour les CM *versus* 50% pour les HDL). La nature des apolipoprotéines diffère aussi d'une particule à l'autre. On remarque que les apolipoprotéines CI, II, III et E sont partagées entre les chylomicrons, VLDL et HDL. Pour les LDL, il n'y a qu'une seule molécule protéique soit l'apoB (forme lourde 100 kDa ; apoB100) et les HDL sont composées des apolipoprotéines de type AI-II, CI-III et E.

1.4.1 Métabolisme des lipoprotéines

Le métabolisme des lipoprotéines est un réseau complexe d'assemblage, de sécrétion, de transport et de catabolisme dans tout l'organisme. Lors de la prise alimentaire

(voie exogène), les acides gras et le cholestérol sont captés par des transporteurs spécifiques à la surface des entérocytes (cellules de l'intestin).^{62, 64} Au niveau de la bordure en brosse de l'intestin, les stérols sont principalement absorbés à l'aide d'une protéine membranaire nommé NPC1L1 (*Niemann-Pick C1 like 1*)^{65, 66}, incorporés dans les chylomicrons, qui sont ensuite sécrétés dans le réseau lymphatique (Fig. 4). Les stérols peuvent aussi être utilisés pour former des particules HDL à l'aide de l'apolipoprotéine apoA-1 et du transporteur ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter*) pour rejoindre également la circulation.^{62, 67-70}

Lipoprotéines	CM	VLDL	LDL	HDL
Densité (g/ml)	< 0.94	0.94-1.006	1.006-1.063	1.063-1.210
Diamètre (nm)	75-120	30-80	18-25	4-10
Protéines (% wt)	1	10	20	50
Apolipoprotéines (apo)	C-III, B, C-I, C-II, D, E	B, C-I, C-II, C-III, E	B	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, E
Lipides (% wt)	98-99	90-92	75-80	40-48
Triglycérides (%)	81-89	50-58	7-11	6-7
Phospholipides (%)	7-9	19-21	28-30	42-51
Esters de cholestérol (%)	2-4	15-23	47-51	24-45
Cholestérol (%)	1-3	4-9	10-12	6-8

Table 1 Propriétés physiques et compositions lipidiques et protéiques des lipoprotéines plasmatiques humaines. (CM, Chylomicrons (CM) < VLDL (*very low density lipoprotein*, lipoprotéines de très basse densité) < LDL (*low density lipoprotein*, lipoprotéines de basse densité) < HDL (*high density lipoprotein*, lipoprotéines de haute densité).

(Source: Modifiée de Oslon RE⁶¹, Vance DE et coll.⁶², Mahley RW et coll.⁶³)

L'excès de cholestérol ingéré peut également être évacué dans la lumière de l'intestin par les transporteurs ABCG5/G8.⁷¹ Les acides gras libres (FFA) dérivés de la digestion peuvent traverser directement la membrane plasmique des entérocytes ou être transportés activement par les protéines apicales FATP4, FAT/CD36 ou FABPpm.⁶⁴ Les

triglycérides (TG) nouvellement synthétisés sont également incorporés aux chylomicrons (CM) à l'aide de la MTPP (*microsomal triglyceride transfer protein*).^{62, 72} Passant par la veine cave, les CM relâchés dans la circulation sanguine sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL), ce qui libère des acides gras libres servant de carburants énergétiques pour les tissus périphériques (cœur, muscles, tissus adipeux, etc.; Fig. 4).⁷³ Au niveau du foie, les chylomicrons résiduels sont par la suite hydrolysés à nouveau par la lipase hépatique (HL) et éliminés de la circulation par le LDLR (récepteur aux LDL) et/ou la LRP1 (*low density lipoprotein receptor-related protein 1*).⁷⁴

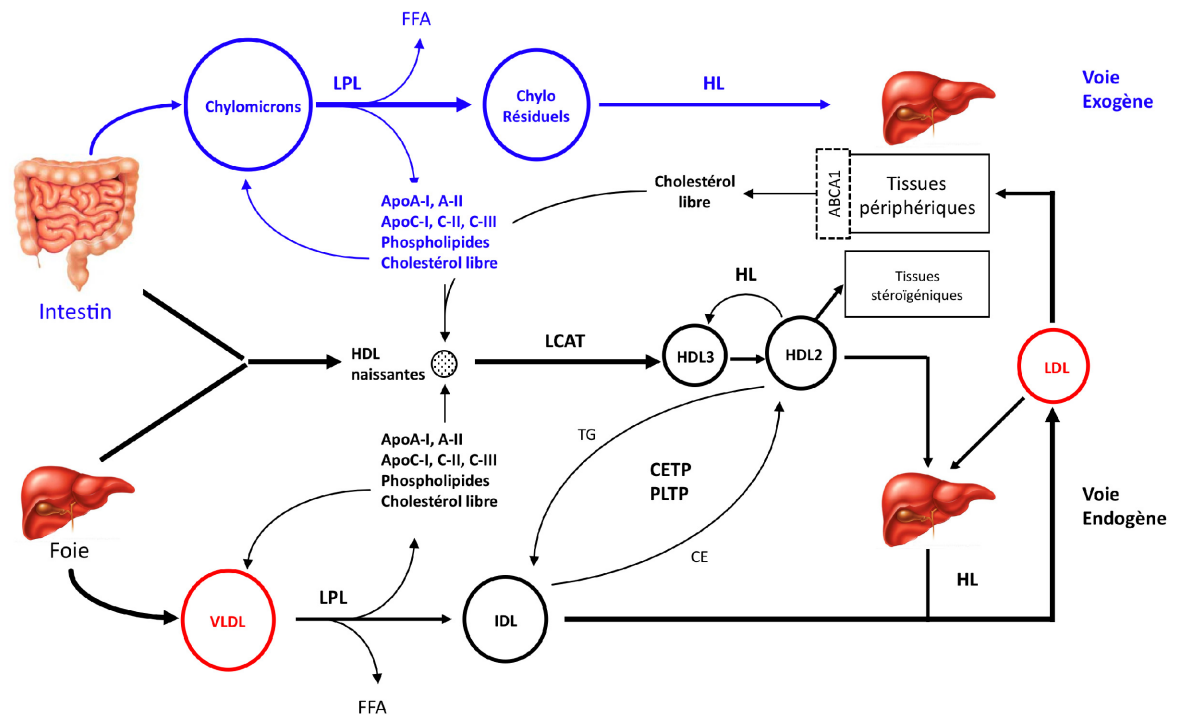


Figure 4 Métabolisme des lipoprotéines humaines. Apo, apolipoprotéines ; CE, esters de cholestérol ; CETP, *cholesteryl ester transfer protein* ; FFA, *free fatty acids* (acides gras libres) ; HDL, *high density lipoprotein* (lipoprotéines de haute densité) ; HL, *hepatic lipase* (lipase hépatique) ; IDL, *intermediate density lipoprotein* (lipoprotéines de densité intermédiaire) ; LCAT, *lecithin:cholesterol acyltransferase* ; LDL, *low density lipoprotein* (lipoprotéines de basse densité) ; LPL, lipoprotéine lipase ; PLTP, *phospholipid transfer protein* ; VLDL, *very low density lipoprotein* (lipoprotéines de très basse densité). Voie métabolique exogène est représentée en bleu, voie endogène en noir. Lipoprotéines athérogéniques sont représentées en rouge.

Les hépatocytes (cellules du foie) contribuent de manière importante à l'homéostasie des lipoprotéines plasmatiques qui est définie comme la voie endogène (Fig. 4).^{36, 62} Les triglycérides (TG) et le cholestérol sont incorporés aux apolipoprotéines B (isoforme B100 ; apoB100) et E au niveau du réticulum endoplasmique pour former les VLDL (*very low density lipoprotein*). Une fois dans la circulation sanguine, les TG contenus dans les VLDL sont hydrolysés par la LPL pour libérer des acides gras libres et engendrer des VLDL résiduelles nommées IDL (*intermediate low density lipoprotein*) qui hydrolysées par la lipase hépatique, conduit à la formation de particules LDL (*low density lipoprotein* ; Fig. 4). Comparativement aux chylomicrons et VLDL résiduelles qui proviennent de l'alimentation et qui sont plutôt riches en TG, les particules LDL sont des réservoirs de cholestérol pour les tissus périphériques (voir Tableau 1 et Fig. 4). Les LDL sont principalement captées et éliminées par les hépatocytes (récepteur aux LDL ; LDLR) et aussi par les tissus extra-hépatiques.^{62, 75, 76}

1.4.2 Éfflux lysosomal du cholestérol dérivé des LDL

Une fois internalisé par le LDLR, les particules LDL sont transportées vers les endosomes tardifs/lysosomes. L'augmentation de l'acidité dans la lumière de ces compartiments cellulaires provoque un relâchement du complexe apoB100(LDL)•LDLR.⁷⁷⁻⁸⁰ Dans les lysosomes, l'apolipoprotéine B est dégradée en acides aminés par les enzymes résidentes et les esters de cholestérol hydrolysés par la lipase lysosomale acide.⁸¹⁻⁸⁴ Le cholestérol libre est ensuite associé à deux protéines résidentes des lysosomes nommées NPC1 et NPC2. Ces deux gènes furent identifiés comme responsable de la maladie létale nommée Niemann-Pick de type C, caractérisée principalement par un défaut d'efflux du cholestérol dérivé des LDL.^{85, 86} Libérée par la lipase lysosomal acide, il fut récemment démontré que la portion hydrophobe du cholestérol lie d'abord la protéine soluble NPC2 pour être ensuite exposer la région hydrophile à NPC1.⁸⁷ NPC1, qui possède plusieurs domaines transmembranaires, permet l'efflux du cholestérol des lysosomes vers d'autres

compartiments cellulaires tels la membrane plasmique, les mitochondries et le réticulum endoplasmique (RE).⁸⁸⁻⁹¹ Il est maintenant bien documenté que NPC1 et NPC2 sont des capteurs du cholestérol provenant des particules LDL jouant de concert un rôle pivot dans la boucle rétroactive de synthèse de *novo* du cholestérol. En effet, l'action de ces deux protéines dans l'efflux du cholestérol des lysosomes vers le réticulum endoplasmique permet de réguler la machinerie transcriptionnelle dictée par les SREBPs (*voir* Chapitre I.1.3).⁹²⁻⁹⁴

1.4.3 Transport inverse du cholestérol

Il existe une autre voie métabolique des lipoprotéines soit le transport inverse du cholestérol qui consiste en son retrait des tissus périphériques.⁹⁵ Les hépatocytes et entérocytes produisent des particules naissantes du type HDL (*high density lipoprotein*). Ces lipoprotéines communément appelées « bon cholestérol » voyagent dans la circulation sanguine où l'apolipoprotéine A1 (apoA-1)⁶⁷, qui interagit avec les transporteurs ABCA1/G1, permet la lipidation des HDL (Fig. 4).^{68-70, 96} Ensuite, une enzyme nommée LCAT (*lecithin:cholesterol acyltransferase*) estérifie le cholestérol capté par les HDL - une étape clé dans le processus de maturation de ces particules.⁹⁷ La CETP (*cholesteryl ester transfer protein*), la PLTP, (*phospholipid transfer protein*) et la lipase endothéliale (EL) restructurent les HDL qui sont alors captées et éliminées par le foie à l'aide du récepteur SR-B1 (*scavenger receptor class B type I*).⁶² Il est maintenant bien accepté qu'une des stratégies pour réduire les incidences cardiovasculaires est de hausser l'efflux de cholestérol par les HDL, en augmentant notamment les niveaux ou l'activité d'apoA-1.⁹⁸⁻¹⁰⁰ La compagnie pharmaceutique Pfizer a développé un inhibiteur de la CETP (TorcetrapibTM) dans le but de limiter l'échange d'esters de cholestérol des HDL vers les VLDL et LDL (TG). Bien que la prémisse était bien favorable (mutations humaines répertoriées pour la CETP)¹⁰¹, les essais cliniques ont révélés que le TorcetrapibTM induit une hausse inattendue de la mortalité dû notamment à une augmentation de la pression artérielle et d'aldostérone.¹⁰² D'autres dérivées verront possiblement le jour très bientôt en

évitant bien entendu cet effet secondaire non négligeable (*e.g.* anacetrapib™ ; Merck).¹⁰³ En plus de permettre le retrait du cholestérol des tissus périphériques, les particules HDL ont aussi des propriétés anti-athérogéniques, anti-inflammatoires et anti-thrombotiques.¹⁰⁴

1.5. L'hypercholestérolémie familiale

1.5.1 Description clinique

Selon l'étude de Framingham, un taux élevé de cholestérol plasmatique est un facteur de risque important pour les maladies cardiovasculaires (MCV ; voir Chapitre I.1.1). À la fin des années 30, il fut remarqué que l'hypercholestérolémie familiale (FH) est un facteur génétique directement associé avec l'apparition prématurée de signes cliniques cardiovasculaires comme l'athérosclérose (rétrécissement de la paroi artériel), la présence de xanthomes (dépôts sous-cutané de lipides) et d'angine de poitrine (manque d'apport d'oxygène au myocarde).¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ L'hypercholestérolémie familiale est une maladie héréditaire dominante des plus répandue avec une prévalence de 1/500 pour les hétérozygotes et 1/1000 0000 pour les homozygotes dans la population.^{107, 108} Dès la naissance, les taux de cholestérol plasmatique sont deux fois plus élevés chez les hétérozygotes (~350 à 550 mg/dL ; 9 à 14 mmol/L) et plus de 500 mg/dL (13 mmol/L) pour les homozygotes. Ces derniers succombent généralement d'un infarctus du myocarde avant l'âge de 20 ans.¹⁰⁸

1.5.2 Hypercholestérolémie autosomal dominante

En 1985, les chercheurs Joseph L. Goldstein et Michael S. Brown ont reçu le prix Nobel de médecine pour avoir identifié un premier locus (emplacement d'un gène dans le génome) lié directement aux taux de cholestérol circulant chez les patients hypercholestérolémiques.¹⁷ Ils ont découvert des mutations humaines dans le gène codant pour le récepteur aux LDL (LDLR ; *low density lipoprotein receptor*, récepteur de lipoprotéines de basse densité, Chapitre I.1.4.1).^{76, 109} En effet, lorsque le LDL récepteur

(responsable de la clairance hépatique des particules LDL circulantes) est non fonctionnel, ces patients ont une hausse importante de ces particules athérogènes dans le sang. Dans la population Canadienne Française, il fut remarqué que 63% des patients hypercholestérolémiques ont une mutation (délétion ~ 10 kb) dans le gène codant pour le LDLR, qui résulte en absence de production de la protéine.^{110, 111} Depuis, plus de 1000 différentes mutations au locus du gène LDLR peuvent expliquer ~63% des causes d'hypercholestérolémie familiale (<http://www.ucl.ac.uk/ldlr/Current/>).^{107, 112, 113} Chez les patients FH, un deuxième locus fut associé au gène codant pour l'apolipoprotéine B (apoB ; composante unique des particules LDL et ligand du LDLR).¹¹⁴ En effet, certaines mutations de l'apoB réduisent considérablement l'affinité des LDL pour le LDLR ce qui, par conséquent, cause aussi une accumulation de ces particules dans la circulation sanguine.^{107, 115, 116}

1.5.3 Hypercholestérolémie autosomal récessive

Une autre forme d'hypercholestérolémie familiale mais de type récessif (doit avoir les deux allèles atteints pour présenter le phénotype) fut associée au gène codant pour la LDLRAP1 (*low density lipoprotein receptor adaptor protein 1*) communément appelé ARH (*autosomal recessive hypercholesterolemia*).^{113, 117} Il s'avère que cette protéine adaptatrice lie la queue cytosolique du LDL récepteur et favorise son internalisation dans les hépatocytes à partir de la membrane plasmique à l'aide de vésicules de clathrine.¹¹⁸⁻¹²³ Une réduction de l'internalisation du complexe apoB/(LDL)•LDLR dans le foie, causée par l'absence d'ARH fonctionnel, conduit donc essentiellement à une hausse des niveaux de cholestérol plasmatique. Jusqu'à tout récemment, l'hypercholestérolémie familiale dominante était expliquée majoritairement par des mutations dans le LDLR, son ligand (apoB) et de manière récessive par la protéine adaptatrice ARH.¹⁰⁸ Ce modèle fut largement utilisé pour comprendre les mécanismes par lesquels certaines molécules circulantes peuvent être internalisées à l'aide d'un récepteur, éliminées du plasma et ensuite métabolisées à l'intérieur de compartiments tels les endosomes tardifs/lysosomes.^{77, 124}

1.5.4 PCSK9: Troisième locus

En collaboration avec le Dre. Catherine Boileau, nous avons récemment identifié un troisième locus de l'hypercholestérolémie familiale autosomal dominante sur le chromosome 1 en position 1p32.¹²⁵ Le gène PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) fut caractérisé comme étant le neuvième membre de la famille des proprotéines convertases par notre laboratoire (originellement nommé NARC-1 ; *neuronal apoptosis-regulated convertase 1*).¹²⁶ Comme illustré à la Figure 5, il existe maintenant 3 loci pouvant expliquer ~85% de l'hypercholestérolémie familiale soit les gènes LDLR (FH1 : Chr 19p13 ; ~67% des cas), apolipoprotéine B (FH2 : Chr 2p23-24 ; ~14% des cas) et PCSK9 (FH3 : Chr 1p32 ; ~2.3% des cas).^{113, 127, 128} Depuis la découverte de PCSK9 en 2003, plusieurs mutations humaines ont été identifiées et classées selon leurs effets sur le LDL-cholestérol plasmatique soit comme gain-de-fonction (**GDF**, **hyper**cholestérolémiantes) ou perte-de-fonction (**PDF**, **hypo**cholestérolémiantes ; Fig. 5). En comparant avec une valeur référentielle de 105 mg/dL (2.7 mmol/L) pour le LDL-cholestérol¹²⁹, on remarque que les mutations **GDF** répertoriées pour PCSK9 s'expriment avec des sévérités différentes sur les taux de cholestérol plasmatique (Fig. 5) : S127R¹²⁵ (142 mg/dL, 3.7 mmol/L), F216L¹²⁵ (137 mg/dL, 3.54 mmol/L), R218S¹³⁰ (216 mg/dL, 5.6 mmol/L), D374Y¹³¹ (350 mg/dL, 9.05 mmol/L) et R469W¹³⁰ (357 mg/dL, 9.23 mmol/L).

À l'inverse, certaines mutations (**PDF**) dans le gène PCSK9 ont été identifiées qui sont associées à des réductions considérables des niveaux de LDL-cholestérol (Fig. 5).^{125, 129, 132-134} En effet, les mutations Y142X et C679X sont responsables de formes tronqués non-fonctionnelles de PCSK9 qui résultent en des hétérozygoties avec des réductions allant respectivement de 105 mg/dL (2.7 mmol/L) à 53 (1.37) et 68 mg/dL (1.75 mmol/L) pour le LDL-cholestérol circulant.¹²⁹ En accord avec ces observations, les auteurs concluent que la perte d'un allèle de PCSK9 (50% de réduction) réduit de 88% le risque cardiovasculaire. Il est important de noter que c'est le premier locus où des mutations perte-de-fonction furent

associées à une baisse des niveaux de cholestérol plasmatique. De plus, deux individus homozygotes pour un PCSK9 non-fonctionnel ($\Delta R97/Y142X$ et $C679X/C679X$) présentent une forte réduction du LDL-cholestérol plasmatique de 85% avec des valeurs de 15 mg/dL (0.38 mmol/L).^{132, 134} Un éditorial publié dans la revue *Science*, par les chercheurs Michael S. Brown et Joseph L. Goldstein, discute que la découverte de PCSK9 nous informe sur les bénéfices d'une réduction à long terme du LDL-cholestérol sur les maladies cardiovasculaires.¹³⁵ En réduisant les niveaux de cholestérol plasmatique, il est donc indéniable que PCSK9 soit une cible thérapeutique de premier choix pour prévenir le développement de MCV.^{136, 137} Comme il sera discuté plus loin, l'inhibition de PCSK9 aura des conséquences directes chez les patients hypercholestérolémiques en plus d'être utile pour moduler l'activité du LDL récepteur chez les personnes où il est exprimé avec une perte de fonction.

1.5.5 Modèles animaux pour PCSK9: effets sur le cholestérol

Afin d'étudier et de comprendre le rôle de PCSK9 sur les niveaux de cholestérol plasmatique, notre laboratoire, ainsi que quelques autres équipes, ont développé certains modèles murins. Comme chez les patients ayant une perte-de-fonction pour PCSK9^{125, 129, 132-134}, l'invalidation génétique de PCSK9 chez la souris (*Pcsk9*^{-/-}) engendre une baisse considérable (~42%) des niveaux de LDL-cholestérol circulant (Fig. 5c).^{138, 139} À l'inverse, une forte augmentation du cholestérol coïncide avec la surabondance de PCSK9 comme dénoté pour les patients hypercholestérolémiques (**GDF** ; Fig. 5c).¹³⁹⁻¹⁴¹ Il est aussi intéressant de noter que cet effet est majoritairement dépendant de la présence du LDL récepteur (Fig. 5c).¹³⁹ De plus, il fut remarqué que les souris *Pcsk9*^{-/-} ont une sensibilité accrue aux statines (inhibiteur de la synthèse du cholestérol, Chapitre I.1.2.1). Il fut donc suggéré qu'en plus d'avoir un effet propre, un inhibiteur de PCSK9 pourrait être aussi utilisé en synergie avec des statines.¹³⁸

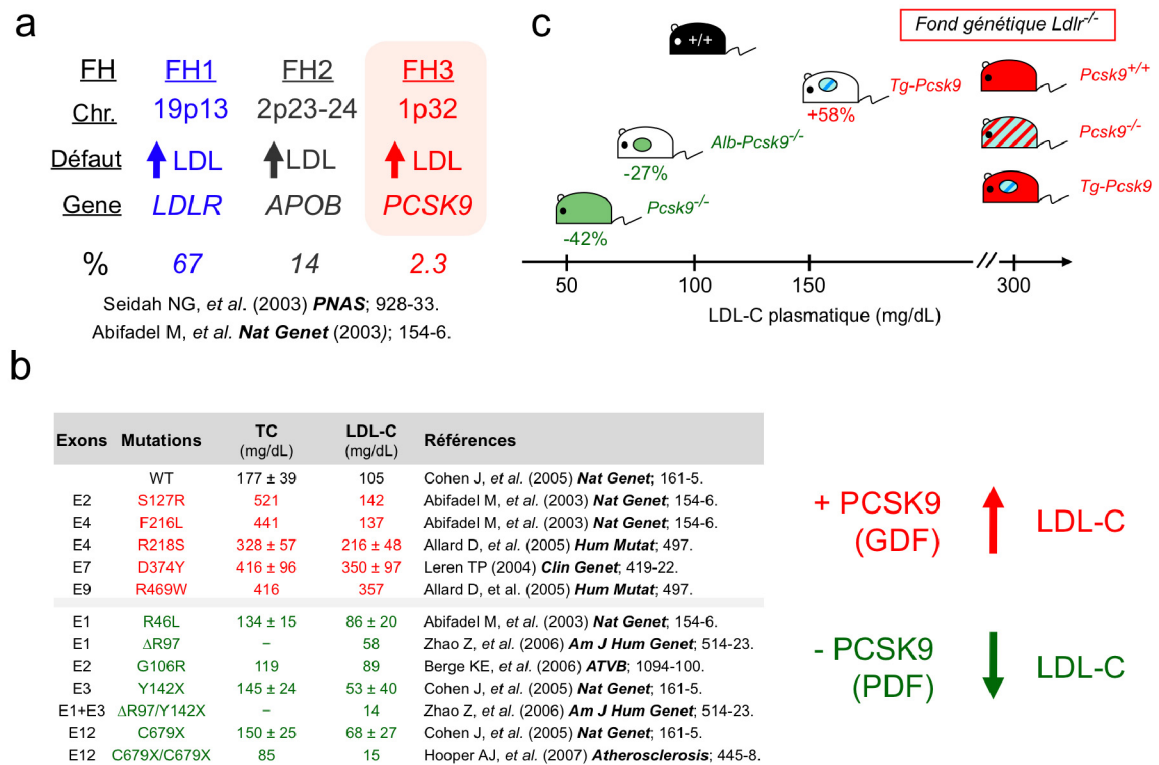


Figure 5 Loci de l'hypercholestérolémie familiale dominante (FH). (a) Trois loci associés à des hauts taux de LDL-cholestérol circulant (LDLR ; 19p13, ApoB ; 2p23-24, PCSK9 ; 1p32). (b) Mutations humaines dans le locus codant pour PCSK9 (hyper- ou hypocholestérolémie). (c) Modèles murins pour LDLR et PCSK9 en fonction de l'impact sur les taux de LDL-cholestérol circulant. *+/+*, type sauvage (référence); TC, cholestérol plasmatique total; LDL-C, *low-density lipoprotein cholesterol* (cholestérol contenu dans les lipoprotéines de basse densité); *Pcsk9*^{-/-}, souris déficientes pour PCSK9, *Alb-Pcsk9*^{-/-}, souris déficientes pour la PCSK9 hépatique seulement; *Tg-Pcsk9*, souris transgénique surexprimant la *Pcsk9* dans les hépatocytes. L'association entre les mutations humaines pour PCSK9 gain de fonction (GDF, haut LDL-C, rouge) ou perte de fonction (PDF, bas LDL-C, vert) et le LDL-C sont représentées.

(Source: Modifiée de Zaid A et coll.¹³⁹ et Seidah NG et Prat A.¹²⁷)

1.5.6 Recherche de nouveaux gènes candidats (GWAS)

Bien qu'on arrive à expliquer près de 85% des cas d'hypercholestérolémie familiale par des mutations associées aux gènes LDLR, apoB et PCSK9, plusieurs études

d'envergure tentent d'identifier par association génétique (GWAS ; *genome-wide association studies*)¹⁴² d'autres loci dans le génome humain. Certaines régions chromosomiques ont été identifiées où des variations génétiques (SNP ; *single nucleotide polymorphism*) furent associées à des marqueurs lipidiques sanguins LDL-C et HDL-C). En plus du LDLR, apoB et PCSK9, les régions génomiques Sort1/CELSR2/PSRC1, HMGCR, B3GALT4, B4GALT4, NCAN/CILP2, ApoE, ABCG5/8, DNAH11, FADS2/3, TMEM57, HNF1A, MAFB et TIMD4-HAVCR1 ont été liées au LDL-cholestérol.¹⁴³⁻¹⁴⁶ Ces nouvelles régions chromosomiques comme les loci LDLR, apoB et PCSK9 furent aussi corrélées au développement de maladies cardiovasculaires.^{120, 121, 124, 125} Récemment, deux nouveaux loci furent suggérés comme quatrième cause de l'hypercholestérolémie familiale soit en position 16q22.1 contenant 154 gènes soit sur le chromosome 8 (8q24.22) où aucune mutation ne fut identifiée dans les gènes candidats connus (LDLR, apoB, PCSK9 et LCAT).^{147, 148} Jusqu'à maintenant, ces études n'ont démontrées que de fortes associations entre certains loci et/ou régions génomiques avec le LDL-cholestérol sanguin et les MCV. Ces pistes bien que très intéressantes nécessitent encore davantage d'investigation.

1.6. PCSK9 : une convertase de proprotéines atypique

1.6.1 Survol des différentes classes de protéases

Les protéases sont des enzymes impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques, notamment dans le développement embryonnaire, la reproduction, la défense immunitaire ainsi que dans de nombreuses pathologies telles que les maladies infectieuses, les désordres neurologiques et le cancer. Une étude comparative des génomes humain et murin a permis de chiffrer à 553 et 628 le nombre de protéases qui compose en soi le « dégradome ».¹⁴⁹ On retrouve cinq types de protéases répertoriées en deux groupes : le premier groupe, « aspartique » et « métallo », utilise une molécule d'eau comme nucléophile pour attaquer le lien peptidique du substrat. À titre d'exemple, la signal peptide peptidase (SPP), qui est une protéase aspartique, catalyse la coupure intramembranaire du

peptide signal de protéines entrant dans la voie sécrétoire.¹⁵⁰ Pour les métalloprotéases, on retrouve notamment les MMPs (*matrix metalloproteinases*) ainsi que les ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinase*) qui sont impliquées respectivement dans la dégradation de la matrice extracellulaire et dans le relargage de protéines membranaires dans le milieu extracellulaire (e.g. facteurs de croissance, cytokines et récepteurs).^{151, 152} Pour ce qui est du deuxième groupe d'enzymes (protéases à cystéine, thréonine ou sérine), elles utilisent plutôt directement un de leurs acides aminés lors des réactions protéolytiques.¹⁴⁹ Dans la classe des protéases à cystéine, on retrouve les caspases impliquées dans la mort programmée cellulaire par apoptose.¹⁵³ La famille des γ -glutamyl transférases, qui catabolisent le glutathion en acide glutamique, font partie des protéases à thréonine.¹⁴⁹ Les convertases de proprotéines (*proprotein convertases* ; PCs) sont des protéases à sérine responsables de la protéolyse de nombreux précurseurs (hormones, glycoprotéines virales, récepteurs, etc.).¹⁵⁴⁻¹⁵⁷

1.6.2 Structure et fonction des convertases de proprotéines

1.6.2.1 Découvertes et motifs de clivage

Au milieu des années quatre-vingt, une souche mutante de la levure *Saccharomyces cerevisiae* fut identifiée de par son incapacité à produire deux peptides biologiquement actifs à partir de précurseurs protéiques soit le facteur de conjugaison α et la toxine *killer 2*.^{158, 159} Le gène responsable de la coupure, et par le fait même de l'activation de ces molécules, fut identifié par complémentation génétique et fut nommé Kex2 (*killer expression 2*). Ce gène code pour une glycoprotéine transmembranaire de 812 acides aminés. La capacité de cette enzyme à couper des précurseurs protéiques à des sites dibasiques (i.e. Lys-Arg et/ou Arg-Arg; KR et/ou RR) est conduit par un site actif (triade catalytique) contenant un acide aspartique (Asp), une histidine (His) et une sérine (Ser).

Suite à l'identification de Kex2 chez la levure, neuf membres de la famille des convertases de proprotéines (PC) furent identifiés par homologies avec des protéases ancestrales du type subtilase. Tout d'abord, on dénombre sept convertases propres à la sous-famille *subtilisin/kexin-like* soit la Furine, PC1/3, PC2, PC4, PACE4, PC5/6, PC7 qui possèdent des motifs de coupures dibasiques : $(K/R)X_n(K/R)\downarrow$ ou $n = 0, 2, 4, 6$.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷ SKI-1/S1P, le huitième membre, est une convertase de la sous-famille de la *pyrolysin* qui possède un motif de reconnaissance hydrophobique : $RX(\text{hydrophobique})X\downarrow$.⁴⁹ Récemment, notre laboratoire fit la découverte de PCSK9 comme neuvième membre des convertases associée à la *protéinase K* avec un motif de clivage atypique : $(V/I)FAQ\downarrow$.^{126, 160}

1.6.2.2 Domaines et mécanisme d'activation

Les convertases de proprotéines comportent plusieurs domaines leurs conférant une structure moléculaire propre. Premièrement, en région N-terminale, on retrouve le peptide signal qui est suivi d'une prorégion, d'un domaine catalytique, d'un domaine P et d'une région C-terminale souvent riche en résidus cystéines (Cys) et histidines (His).¹⁵⁴⁻¹⁵⁷ Le peptide signal est composé de résidus à caractère hydrophobique qui permet aux protéines nouvellement synthétisées, de quitter le cytosol et d'entrer dans le réticulum endoplasmique (RE) pour ensuite rejoindre la voie sécrétoire.¹⁶¹ Un fois le peptide signal retiré, la synthèse de la prorégion joue un rôle essentiel quant au bon repliement et au contrôle de qualité de la pochette enzymatique en formation. Ceci permet notamment de réguler temporairement l'activité enzymatique, puisque celle-ci demeure étroitement liée au domaine catalytique, jusqu'à ce que les conditions et les lieux propices soient rencontrés.^{126, 162-164} Comme discuté précédemment, on retrouve dans le noyau de l'enzyme, une triade catalytique fortement conservée composée d'un acide aspartique, d'une histidine et d'une sérine.¹⁶⁵ En plus de ces acides aminés critiques, certains résidus avoisinants, à l'intérieur de la pochette enzymatique, imposent la formation d'un environnement spécifique propre à chacune des convertases.^{166, 167} Lorsque bien repliée, la convertase subit une coupure autocatalytique

spécifique entre sa prorégion et son domaine catalytique lui permettant ainsi d'être libérée du RE (Chapitre I, 1.6.2.1). Une fois dans le bon compartiment cellulaire, la prorégion se détache en nécessitant, dans certains cas, une seconde coupure permettant à l'enzyme de couper des substrats en *trans*.¹⁵⁴ Il est important de noter que jusqu'à présent, la convertase PCSK9 fait exception à la règle, puisque sa prorégion ne semble pas se détacher du domaine catalytique et aucun substrat ne fut identifié outre sa propre autoactivation.¹⁶⁸

Suite au domaine catalytique, on retrouve une région C-terminale qui varie beaucoup au sein des convertases. Les convertases PC1/3 et PC2 présentent des profils d'hélices amphipathiques en C-terminal impliquées notamment dans leurs adressages vers les granules de sécrétion.¹⁶⁹ Les fonctions biologiques de ces domaines demeurent encore très peu connues bien qu'il fut rapporté que pour PC5/6, ce domaine participe à la stabilisation de sa pochette catalytique et que pour la Furine, ce domaine est plutôt impliqué dans son relargage dans le milieu extracellulaire.^{170, 171} Il fut aussi observé que l'isoforme PC5/6A (épissage alternatif de l'ARNm de PC5/6) ainsi que PACE4, qui sont des convertases sécrétées dans le milieu extracellulaire, peuvent être retenues à la surface cellulaire par leurs domaines C-terminaux riches en cystéines.^{172, 173} Il est maintenant bien évident que les domaines C-terminaux des convertases possèdent des fonctions biologiques propres comme dénoté pour la PCSK9, qui sera discuté plus loin.^{174, 175}

1.6.2.3 Distribution tissulaire et localisation cellulaire

Bien que les PCs soient essentiellement localisées dans la voie sécrétoire régulée et constitutive, leurs distributions cellulaires varient d'une convertase à l'autre. En effet, on retrouve PC1/3, PC2 et PC5/6A (isoforme soluble de PC5/6) dans les granules de sécrétion. Tandis que la Furine, PC5/6B (isoforme transmembranaire de PC5/6) et PC7 se retrouvent plutôt à la surface membranaire. Cette particularité s'explique par le fait que ces convertases possèdent des structures transmembranaires de type I. Outre sa localisation à la surface cellulaire, la Furine est aussi endocytée grâce à la participation de plusieurs acides

aminés situés dans sa queue cytoplasmique (les résidues YKGL₇₆₅, le dipeptide LI₇₆₀ et la Phe₇₉₀). Ces résidus sont donc nécessaires à la liaison de la Furine à la sous-unité $\mu 2$ de la protéine adaptatrice de clathrine AP-2, ce qui lui permet d'être incorporée dans les endosomes précoces.^{154, 163, 176} Les convertases SKI-1/S1P et PCSK9 se trouvent principalement dans le RE, le réseau *trans*-golgien (RTG) et les endosomes tardifs/lysosomes (ET/L) ainsi que dans l'espace extracellulaire.^{177, 178}

Pour ce qui est de la distribution tissulaire, les convertases Furine, PC5/6, PACE4, PC7 et SKI-1/S1P sont exprimées de manière très large. Bien qu'ubiquitaire, la Furine est fortement présente dans le foie et la rate alors que PC7 est plutôt abondante dans l'amygdale, thymus et colon. Chose intéressante, la Furine, PC5/6, et PC7 sont aussi fortement exprimées dans les cellules vasculaires prolifératives du muscle lisse dans l'aorte de rat.^{154, 179} PC1/3 et PC2 sont des convertases retrouvées principalement dans les cellules neuronales (cerveau et hypophyse), le système endocrinien (i.e. pancréas) ainsi que dans l'intestin.¹⁸⁰ Cette distribution spécifique explique leur implication dans l'activation de nombreuses hormones tels la β -endorphine, la tyrotropine, l'insuline et le glucagon.¹⁸¹⁻¹⁸⁴ Pour sa part, PC4 est strictement localisée dans les tissus germinaux tout particulièrement dans les spermatocytes et les spermatides arrondis dans les testicules.^{185, 186} Des études d'expression ontogénique ont démontré un profil d'expression particulier pour la convertase PCSK9. Au cours du développement embryonnaire, PCSK9 est présente de manière transitoire dans le système nerveux central (télencéphale, jour E12-13; cervelet, jour E17-P20) et aussi dans le bulbe olfactif chez l'adulte.¹²⁶ Elle présente également une régulation transcriptionnelle transitoire dans le rein au jour P6 où elle est strictement exprimée dans le cortex suivi séquentiellement d'une expression plus restrictive dans la médulla rénale chez l'adulte. Durant l'embryogenèse (jour E15), on remarque aussi l'expression de la PCSK9 dans le foie, la peau et le petit intestin. Il est à remarquer que PCSK9 est exprimée dans des régions où l'on observe une différenciation cellulaire de cellules souches multipotentes, ce qui suggère que PCSK9 est possiblement impliquée au cours de la neurogenèse, la néphrogenèse et l'hépatogenèse.^{126, 187} Chez l'adulte, on

retrouve majoritairement et presque exclusivement PCSK9 dans des centres cholestérogéniques tels le foie, l'intestin et le rein.¹²⁶

1.6.3 Régulation transcriptionnelle de PCSK9

1.6.3.1 Statines et facteurs cholestérogéniques

Comme discuté précédemment, les statines inhibent la *néo*-synthèse du cholestérol en bloquant l'HMG-CoA réductase, étape limitante dans la voie métabolique du mévalonate (Chapitre I.1.2.1, Fig. 2). Par boucle rétroactive, les statines ont aussi pour effets d'augmenter la transcription de gènes cholestérogéniques par l'entremise des SREBPs. En plus des gènes HMG-CoA réductase et LDLR, il fut remarqué que l'ajout de statines augmente aussi les niveaux de l'ARN messager de PCSK9 renforçant son implication dans le métabolisme du cholestérol.⁴⁵ En effet, chez l'humain, la souris et le rat, on retrouve dans la séquence du promoteur proximal de PCSK9 des boîtes de reconnaissance à l'ADN du type SRE (*sterol regulatory element*) et Sp1, importants pour la réponse et la sensibilité cholestérogénique.⁴⁵ Chez des patients traités avec une dose d'atorvastatine de 40 mg/jour pendant 16 semaines, il fut rapporté que les niveaux de PCSK9 dans la circulation sanguine sont augmentés de ~34% et que la présence d'ezetimibe (inhibiteur de NPC1L1 qui bloque l'apport alimentaire en cholestérol) avait un effet synergétique sur l'augmentation des niveaux de PCSK9 dans le plasma.¹⁸⁸⁻¹⁹³ Deux études ont démontré qu'une diète riche en cholestérol et que plus spécifiquement les facteurs de transcription cholestérogéniques SREBP-1a et SREBP-2 (*sterol regulatory element binding protein*; Chapitre I.1.3) régulent directement l'expression hépatique de PCSK9 *in vivo* conjointement avec de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol.^{44, 194} En utilisant un modèle cellulaire de l'épithélium intestinale humain (Caco-2), il fut aussi rapporté que la régulation transcriptionnelle de PCSK9 est aussi sensible à la présence de cholestérol comme observé dans les cellules hépatiques.¹⁹⁵ Finalement, plusieurs équipes ont dénoté une corrélation directe entre la concentration plasmatique de

PCSK9 et celle du LDL-cholestérol possiblement dû à un contrôle transcriptionnel parallèle à celui du cholestérol.^{191, 196-198}

1.6.3.2 LXR et acides biliaires

Les récepteurs aux oxystérols (ou LXR ; *liver X receptor*) contrôlent de nombreux gènes et voies métaboliques importantes pour la balance et l'homéostasie du cholestérol notamment dans la transcription de gènes impliqués dans la conversion de stérols en acides biliaires, qui sont ensuite éliminés dans la lumière de l'intestin.^{19, 199, 200} La forme LXR β est exprimée de manière ubiquitaire tandis que le LXR α est présent plus spécifiquement dans le foie, les macrophages, l'intestin et le tissu adipeux. De concert avec l'activation des SREBPs, il fut observé que l'expression de PCSK9 est sensible à la présence d'agonistes des LXR.^{194, 201, 202} De plus, lorsque des patients ayant des calculs biliaires furent traités avec de la cholestyramine (résine chélatrice de sels biliaires), des augmentations de ~65-70% furent remarquées pour les ARN messagers codant pour le LDLR et PCSK9.²⁰³ Des résultats contradictoires furent dénotés quant à l'utilisation de l'acide chénodéoxycholique (acide biliaire primaire ; CDCA) sur l'expression de PCSK9 soit en n'ayant aucun effet ou en diminuant l'expression de PCSK9.^{203, 204} Bien qu'étroitement lié à l'activité des SREBPs, l'action des LXRs et des acides biliaires sur la régulation transcriptionnelle de PCSK9 demeure encore controversée.

1.6.3.3 Berbérine et HNF-1 α

La Berbérine (BBR), isolé à partir de la racine d'une plante (*Hydrastis canadensis* ou Hydraste du Canada), est une molécule de type alcanoloïde qui possède des propriétés antifongiques, antibactériennes et anti-inflammatoires.²⁰⁵⁻²⁰⁸ Il fut aussi remarqué que la BBR avait un fort potentiel réducteur sur les taux de cholestérol (~30%) chez des patients hypercholestérolémiques.^{209, 210} Ceci fut expliqué notamment par un accroissement de la stabilité de l'ARNm du LDLR activée par la voie de signalisation des ERK (*extracellular*

signal-regulated kinase). De plus, il fut observé que la BBR diminue considérablement l'expression de PCSK9, ce qui pourrait être utilisé conjointement avec une statines.²¹¹

Récemment, le facteur de transcription HNF-1 α ²¹², contrôlé par la présence d'acides biliaires²¹³, fut rapporté comme *trans*-activateur de PCSK9 où un motif de reconnaissance situé à 28 nucléotides en amont du SRE (*sterol regulatory element*) dans le promoteur fut identifié.²¹⁴ En plus de réguler de nombreux gènes dans le tissu hépatique²¹⁵, l'expression de PCSK9 est étroitement liée à l'activité de HNF-1 α et SREBP. En présence de Berbérine, les niveaux cellulaires de ces deux facteurs (HNF-1 α et SREBP) sont diminués, ce qui pourrait provoquer la réduction accrue de PCSK9 observée.²¹⁴ Ceci fut même proposé pour expliquer la résistance qu'ont les hamsters sur l'effet hypolipidémiant des statines. Contrairement aux humains, la présence de statines favorise l'expression de HNF-1 α et de SREBP chez le hamsters, augmentant directement les niveaux de PCSK9, pour qui la surabondance fut associée à une hypercholestérolémie.²¹⁶ Par contre, l'absence d'induction synergique de PCSK9 par HNF-1 α et SREBP confère, chez les humains, une sensibilité accrue aux statines.

1.6.3.4 Fibrates

Depuis les années 30, certaines molécules amphipathiques du type « fibrates » sont largement utilisées pour leurs propriétés hypolipidémiantes.²¹⁷ En effet, les fibrates ont montrées de bons résultats quant à diminuer les niveaux de triglycérides, de LDL ainsi que d'augmenter les HDL réduisant, par conséquent, les risques de développer des maladies cardiovasculaires.²¹⁸ Plus de soixante années plus tard, les PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) furent identifiés comme étant des cibles des fibrates et de certains lipides.²¹⁹ Ces récepteurs nucléaires forment des hétérodimères avec le RXR (*retinoïd X receptor*) et activent de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des hydrocarbures et des lipides en plus de moduler la différenciation des adipocytes.²²⁰ Chez la souris et l'humain avec ou sans statines, il fut remarqué qu'un traitement aux fénofibrates

réduisait légèrement les niveaux de PCSK9 dans la circulation sanguine.^{197, 221, 222} Il fut aussi suggéré que les fénofibrates augmentent la production des convertases PC5/6A et furine impliqués dans le catabolisme de PCSK9, ce qui pourrait contribuer de manière synergique à la réduction observée dans le plasma.²²³

1.6.4 PCSK9 et apoB100

Une étude comparative réalisée chez des patients hypercholestérolémiques soit ayant une mutation pour PCSK9 (S127R) ou un LDLR non-fonctionnel a permis de tirer des associations entre PCSK9 et la sécrétion d'apoB100 dans le plasma par les hépatocytes. Les auteurs ont remarqué que la mutation gain-de-fonction S127R de PCSK9 favorise une augmentation de l'apoB100 dans la circulation sanguine principalement dû à une production accrue de VLDL (~3X), IDL (~3X) et LDL (~5X).²²⁴ Il fut aussi suggéré que la surexpression de PCSK9 dans les hépatocytes hausse la sécrétion de particules apoB100 de manière LDLR indépendante.²²⁵ Il est possible que l'effet observé de PCSK9 sur l'apoB100 ne soit qu'un artéfact de surabondance puisque qu'une plus faible surexpression n'a aussi présenté aucun changement.^{139, 140} L'effet sur la hausse de la sécrétion d'apoB100 en condition de surabondance ou pour la mutation S127R pourrait être attribuable à une fonction propre.²²⁶ De plus, il semble que l'absence de PCSK9 n'affecte pas le profil FPLC (distribution du cholestérol/lipoprotéines) dans des souris LDLR-déficientes. Ceci suggère que l'effet de l'absence de PCSK9 sur la réduction des particules LDLs (apoB100) plasmatiques serait plutôt attribuable à une clairance hépatique (LDLR-dépendante) augmentée qu'une diminution de sa synthèse dans le foie.^{138, 139} Chose intéressante, une étude a dénoté que le taux de sécrétion hépatique des VLDLs, par l'entremise de l'apoB100 (Chapitre I.1.4.1), serait dépendante de la présence du LDLR.²²⁷ En effet, une interaction entre l'apoB100 nouvellement synthétisée et le LDLR dans le réticulum endoplasmique modulerait sa dégradation intracellulaire réduisant ainsi la production de VLDLs.^{228, 229} L'interrelation entre la PCSK9, le LDLR et la sécrétion d'apoB100 nécessite davantage

d'analyses pour bien distinguer la balance entre la clairance des LDLs et la production des VLDLs en présence de PCSK9 avec ou sans LDLR.

1.6.5 Biochimie structurale de PCSK9

NARC-1 (*neural apoptosis-regulated convertase-1*), premier nom donné à PCSK9, fut clonée par deux compagnies pharmaceutiques distinctes (Eli Lilly et Millennium Pharmaceuticals) soit d'une part à partir d'une banque d'ADN complémentaire de gènes de la voie sécrétoire et provenant de neurones induites en apoptose. Indépendamment, en utilisant des oligonucléotides dégénérés à partir de la séquence du domaine catalytique conservé de SKI-1/S1P, notre laboratoire a pu identifier PCSK9 comme neuvième membre des proprotéines convertases.¹²⁶ Au niveau ancestral, cette nouvelle convertase possède ~42% d'homologie avec la protéinase K. La forme zymogène (forme précurseur) est autoactivée dans le réticulum endoplasmique au site SVFAQ₁₅₂↓SIPWN pour ensuite être sécrétée avec sa prorégion dans le milieu extracellulaire (Fig. 6).^{126, 160}

1.6.5.1 Synthèse, activation et catabolisme

Comme les autres convertases, PCSK9 est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE) sous forme de zymogène inactif nommé préproprotéine (Fig. 6).¹²⁶ La plupart des protéines de la voie sécrétoire contiennent en N-terminal, un peptide signal qui les ciblent vers le RE. Dès le début de la traduction de l'ARNm, une protéine nommée la SRP (*signal recognition particule*) se lie au peptide signal naissant du ribosome. Le complexe ainsi formé, s'attache de manière GTP-dépendante à son récepteur, qui ancré dans la membrane, permet le transport de la protéine à travers la membrane du RE (translocon).²³⁰ Le peptide signal est ensuite retiré par une enzyme, nommée la « *signal peptidase* », qui coupe la chaîne peptidique naissante à l'intérieur même de la membrane, libérant ainsi la protéine *néo*-synthétisée dans la lumière du RE.²³¹ Séquentiellement au peptide signal, on retrouve une séquence nommée prorégion propre aux membres de la

famille des convertases de proprotéines. Elles possèdent plusieurs rôles importants dans l'intégrité, le transport et la fonction enzymatique des convertases. La prorégion participe principalement au bon repliement du domaine catalytique et demeure étroitement liée au domaine catalytique empêchant ainsi l'activation précoce de proprotéines (hormones, récepteurs, glycoprotéines virales, etc.).¹⁶³

Une fois la synthèse complétée, PCSK9 subit une coupure autocatalytique dans le RE à la position Gln152 permettant sa sécrétion dans l'espace extracellulaire ou le plasma.^{126, 160} Cette autoactivation primordiale est un gage de qualité de la PCSK9 *néo-synthétisée*. Lorsque certains résidus du domaine catalytique sont mutés (H226A ou S386A), il n'y a pas d'autoactivation catalytique où PCSK9 est donc séquestrée dans le RE et donc pas sécrétée.^{126, 140} Il en va de même pour les résidus présents dans la prorégion importants pour le bon repliement du domaine catalytique.^{126, 225} Par contre, il est possible de forcer la sécrétion d'une forme catalytiquement inactive de PCSK9 en exprimant séparément, et de concert, la prorégion conjointement avec la domaine catalytique actif ou muté (inactif).²³² Il fut aussi remarqué que le domaine C-terminal (CHRD; *Cys/His-rich domain*, Fig. 6) n'est pas nécessaire à la sécrétion et l'autoactivation de PCSK9.^{174, 178} Par contre, un mauvais repliement du CHRD, causé notamment par un pont disulfure manquant (C679X), peut provoquer une rétention de PCSK9 dans le RE. Cette mutation du type « perte-de-fonction » est associée à une réduction du cholestérol plasmatique.^{129, 132} L'identification de mutations naturelles humaines pour PCSK9 nous ouvre des pistes quant à la structure/fonction de cette convertase. Entre autre, notre laboratoire a pu identifier que les convertases PC5/6A et furine clivent et inactivent PCSK9 au site R218.²³³ Lorsque l'arginine est mutée en sérine (R218S), il y a absence de catabolisme de PCSK9, donc une hausse du cholestérol circulant chez ces patients.¹³⁰ De plus, il fut observé que la mutation D374Y affecte aussi le clivage de PCSK9 au site R218 par PC5/6A et furine.

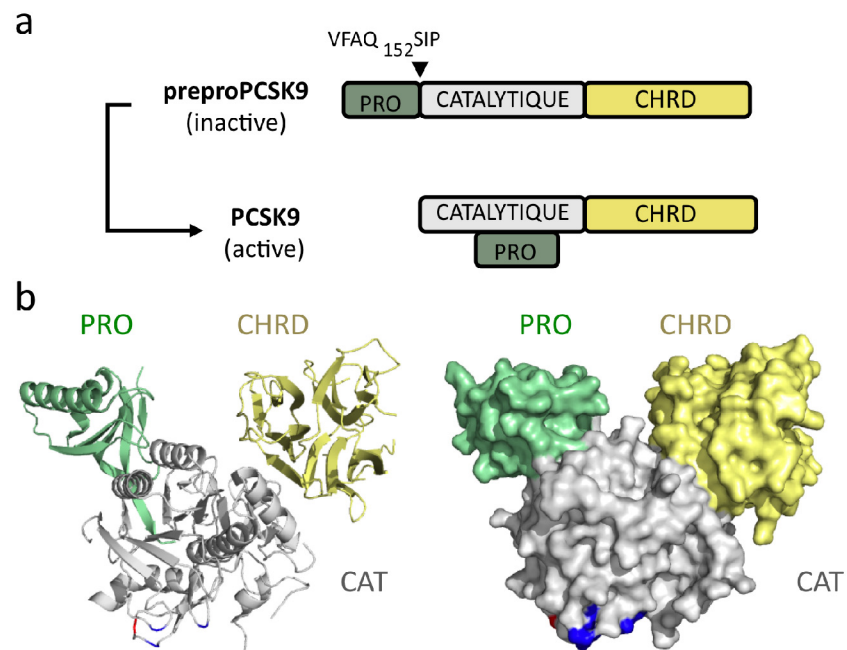


Figure 6 Structure de PCSK9. (a) représentation des domaines de PCSK9 et mécanisme d'autoactivation. La forme preproPCSK9 (inactive) est autocatalytiquement convertie (position Gln/Q152) en PCSK9 (active). Suite au clivage, la prorégion (PRO ; vert) demeure étroitement liée à la pochette enzymatique du domaine catalytique (CAT ; gris). Le domaine C-Terminal (CHRD ; jaune) est structurellement séparé. (b) structures cristallographiques de PCSK9 sous forme « *ruban* » à gauche et « *surface* » à droite. Les domaines prorégion (PRO ; vert), catalytique (CAT ; gris) et C-Terminal (CHRD ; jaune) sont illustrés. Structures déterminées à partir de MacPymol (PDB 2P4E).¹⁶⁸

1.6.5.2 Analyses cristallographiques

Plusieurs équipes ont cristallisé la PCSK9 où on remarque bien la présence de trois domaines distincts soit la prorégion, le domaine catalytique et le domaine C-terminal riche en cystéines et histidines (CHRD; *Cys/His-rich domain*, Fig. 6b).^{168, 234, 235} Comme suggéré par des études biochimiques, l'histidine du site actif (His226) forme un pont hydrogène avec la Glutamine en position 152, ce qui confirme le site exact de l'autoactivation. Suite au clivage, la prorégion demeure étroitement liée non-covalamment à la triade catalytique (Ser386, His226 et Asp186) de PCSK9. L'orientation tridimensionnelle des domaines de

PCSK9 s'apparente à une structure triangulaire où la prorégion et le CHRD sont à la fois opposés et orientés un envers l'autre (Fig. 6b). Il est à noter que les résidus 31 à 60 de la prorégion ne figurent pas dans les analyses cristallographiques, principalement dû à un désordre structural. La portion C-terminale (CHRD) comporte trois sous-domaines distincts soit M1, M2 et M3 qui sont composés de feuillets β orientés sous forme d'hélice. Il est évident que le CHRD possède une structure bien distincte du reste de la protéine (prorégion et domaine catalytique) qui fut apparentée à l'homotrimère de la résistine.²³⁵

1.6.5.3 Modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles ont souvent des rôles à jouer dans la signature propre d'une protéine. Lors de la maturation des protéines, certains groupements fonctionnels peuvent être ajoutés spécifiquement aux acides aminés leur conférant des fonctions et structures bien particulières (i.e. acétylation, méthylation, biotinylation, glycosylation, isoprénylation, phosphorylation, sulfatation, etc.).²³⁶ La formation d'un pont disulfure entre deux cystéines d'une même protéine fait aussi partie des modifications post-traductionnelles importantes dans l'établissement de la structure tertiaire d'une protéine.²³⁶ Plusieurs modifications post-traductionnelles furent répertoriées pour PCSK9 (Fig. 7a).²³⁷ Par mutagenèse dirigée, il fut remarqué que l'asparagine 533 (N533) est N-glycosylée et que la tyrosine 38 (Y38) est sulfatée dans le réseau *trans*-golgien.^{178, 225} De plus, les sérines 47 et 688 (S47 et S688) sont phosphorylées, ce qui pourrait expliquer en partie la perte de fonction du mutant naturel R46L.²³⁸ Les rôles exacts de ces modifications sur la structure et l'activité de PCSK9 restent à être identifiés.

1.7. PCSK9 : un passeport pour la dégradation du LDLR

1.7.1 Liaison de PCSK9 au LDLR

Comme discuté précédemment (Chapitre I.1.5.4), une corrélation directe existe entre la présence de PCSK9 et les niveaux de LDL-cholestérol circulant. Puisque le LDL récepteur (LDLR) joue un rôle majeur dans la clairance des particules LDLs dans le plasma, une possible interaction entre PCSK9 et celui-ci fut d'abord testée. Par des études de coexpression, il fut démontré que la PCSK9 coimmunoprécipite avec le LDLR suggérant une interaction directe entre ces deux protéines.²³⁹ De plus, ces auteurs ont remarqué, par immunobuvardage d'affinité, que la PCSK9 purifiée lie spécifiquement le LDLR immobilisé sur une membrane. Cette liaison est accentuée pour le mutant D374Y de PCSK9 sur le LDLR. Par la suite, il fut aussi dénoté que l'affinité de PCSK9 pour le LDLR (domaine extracellulaire; ECD) est accrue (~170X) à un pH avoisinant celui des compartiments acides tels les endosomes tardifs/lysosomes (pH 5.4).¹⁶⁸ Des études biochimiques ont ensuite déterminé que le domaine EGF-A²⁴⁰ (*epidermal growth factor-like A*) du LDLR est responsable de l'interaction avec la PCSK9.²⁴¹ Ce domaine distinct de celui de liaison aux apolipoprotéines (L4-L5), fut suggéré comme important dans le mécanisme de relâche des LDL dans les endosomes tardifs/lysosomes.²⁴²

Une étude cristallographique a révélé plus spécifiquement que la surface du domaine catalytique de PCSK9, et non la pochette enzymatique, lie directement le domaine EGF-A du LDLR (Fig. 7b).²⁴³ Par extrapolation, on remarque que les autres domaines de PCSK9 (prorégion et CHRD) sont opposés au reste du LDLR. Il est important de noter que la co-cristallisation du complexe PCSK9•EGF-AB fut réalisée à pH neutre. Puisque la structure du domaine extracellulaire complet du LDLR fut élucidée à pH acide, l'extrapolation de l'interaction PCSK9•LDLR à partir du complexe PCSK9•EGF-AB contient certaines limitations.^{78, 243} Il serait donc intéressant de co-cristalliser PCSK9 et le

LDLR complet à un pH endosomal à savoir si d'autres résidues pourraient participer à l'interaction. Les résidues impliqués dans l'interface PCSK9•EGF-A sont les suivants : D238•N295, S153•D299, D374•H306, T377•N309 et R194•D310. Lors du clivage autocatalytique de PCSK9 en position Q152, le groupement amine du résidu S153 nouvellement libéré forme un pont hydrogène avec l'acide aspartique D299 du LDLR. À partir de ces observations, il fut d'ailleurs proposé que les résidus D374 de PCSK9 et H306 du LDLR soient cruciaux pour la sensibilité au pH du complexe. En effet, les mutants naturels « gain-de-fonction » hypercholestérolémiant D374Y (PCSK9) et/ou H306Y (LDLR) furent expliqués par une liaison réciproque très fortement augmentée. De plus, ces mutations engendrent une insensibilité à la diminution de pH qui, normalement, accroît l'association de PCSK9 au LDLR.²⁴⁴ Aussi, il fut remarqué que le domaine CHRD n'est pas essentiel pour la liaison de PCSK9 au LDLR, mais s'avère être crucial pour sa fonction.^{174, 245}

1.7.2 PCSK9 un inhibiteur naturel du LDLR

Préalablement à l'interrelation directe entre ces deux protéines, il fut observé que la surabondance de PCSK9 hépatique diminuait considérablement, presque totalement, les niveaux protéiques du LDLR de manière post-traductionnelle (+/+ vs *Tg*⁺, Fig. 7c, d).^{138, 140, 141, 225} À l'inverse, en absence de PCSK9, les niveaux de LDLR sont fortement augmentés (+/+ vs -/-, Fig. 7c, d). Il fut remarqué que la présence de PCSK9 n'affecte pas les niveaux protéiques de la LRP (*low density lipoprotein receptor-related protein*), qui partage des structures avoisinantes au LDLR. Cette forte réduction n'est pas due à un possible relargage induit par la présence de PCSK9, puisqu'aucune différence ne fut observée quant à la quantité de LDLR relâché dans l'espace extracellulaire. Comme le nombre de LDLR à la surface des hépatocytes a une conséquence directe sur la clairance des particules LDL dans le plasma, ceci pouvait donc expliquer la corrélation entre les mutations humaines pour PCSK9 et leurs effets sur le cholestérol circulant (Chapitre I.1.5.4, Fig. 5). En effet, plus il y a de PCSK9, moins il y a de LDLR et donc une

hypercholestérolémie et *vice versa* (Fig. 17; voir Annexe I). Dans les souris déficientes pour la PCSK9 (-/-), on observe une forte augmentation des niveaux de LDLR à la surface des hépatocytes, ce qui cause une réduction considérable des taux de LDL-cholestérol circulant (Fig. 7d, e).^{138, 139} Cette hausse des niveaux protéiques du LDLR est la conséquence d'une réduction de la dégradation du récepteur induite par la présence de PCSK9.

Bien qu'il existe une corrélation inverse évidente entre PCSK9 et le LDLR, le mécanisme de dégradation demeure méconnu. Au fil des publications, certaines études ont offert quelques indices intéressants. Lorsque des cellules HepG2 furent traitées avec de la Brefeldin A (inhibe le transport du RE au *cis*-Golgi) ou le nocodazole (interfère avec la polymérisation des microtubules), la dégradation du LDLR induite par PCSK9 fut bloquée suggérant que l'action de PCSK9 survient dans un compartiment en aval du RE.²⁴⁶⁻²⁴⁸ L'ajout d'inhibiteurs du protéasome (MG132 et lactacystin) n'a pas affecté la capacité de PCSK9 à dégrader le LDLR. Le protéasome est une structure cellulaire importante qui contrôle, par voie de dégradation, la demie-vie des protéines cytoplasmiques et de la voie sécrétoire (réponse ERAD; *endoplasmic reticulum (ER)-associated protein degradation*) dans le RE.²⁴⁹ De plus, l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs pour les métalloprotéases (phosphoamidon), protéases à cystéine (E64d) et à acide aspartique (pepstatin) n'a montrée aucun impact.²⁴⁸ Par contre, le chlorure d'ammonium utilisé comme agent neutralisant du pH intracellulaire, a renversé la dégradation du LDLR induite par PCSK9.^{225, 248}

Jusqu'à maintenant, il est difficile de prédire si l'effet du chlorure d'ammonium est attribuable à l'inhibition des hydrolases résidentes des lysosomes ou à un trafic vésiculaire affecté.^{250, 251} Des études de co-localisation dans divers modèles cellulaires ont montrées que la PCSK9 se retrouve principalement des les compartiments vésiculaires tels les endosomes précoces, tardifs ainsi que dans les lysosomes.^{178, 239} Dans les hépatocytes primaires, il fut démontré que la localisation majoritaire de PCSK9 dans le Golgi (GM130-positif) est dépendante de la présence du LDLR.¹⁷⁸

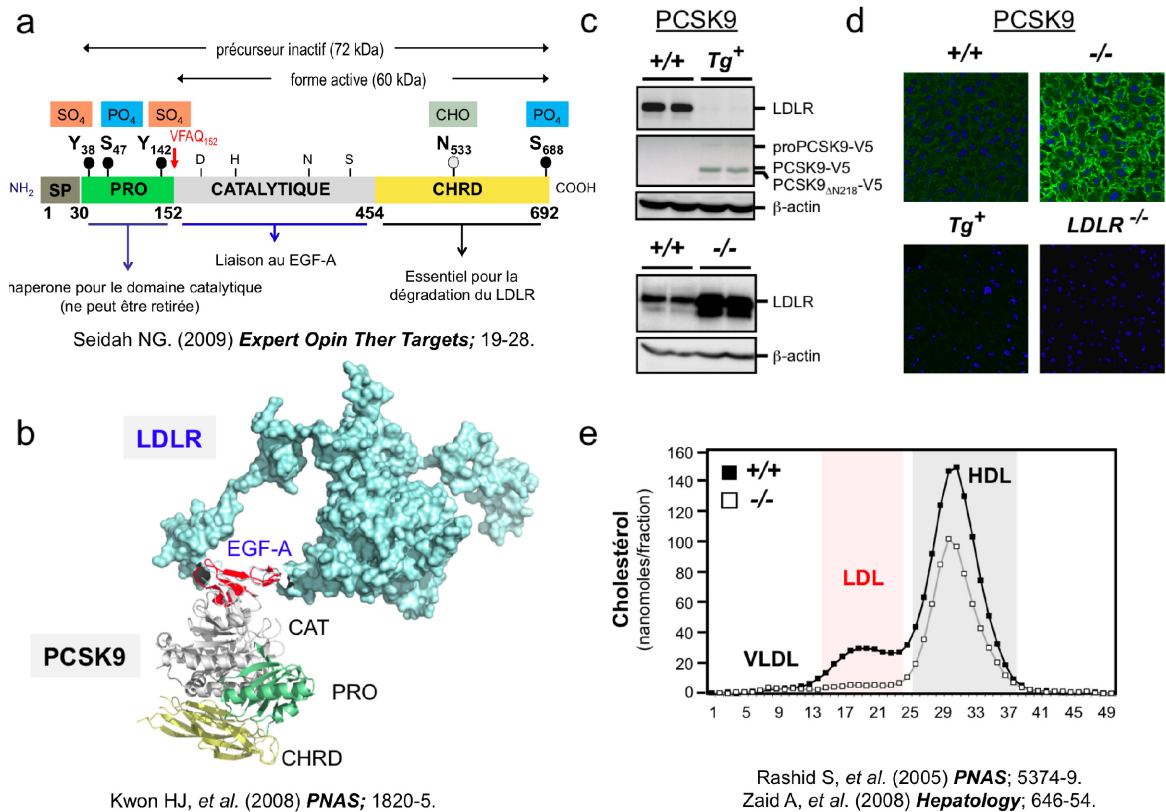


Figure 7 PCSK9 induit la dégradation du LDLR. (a) représentation des domaines de PCSK9 et modifications post-traductionnelles. La forme preproPCSK9 (inactive ; ~72 kDa) est autocatalytiquement convertie (position Gln/Q152 ; VFAQ₁₅₂) en PCSK9 (active ; ~60 kDa). Le peptide signal (SP ; brun), la prorégion (PRO ; vert), le domaine catalytique (CATALYTIQUE ; gris) et le domaine C-Terminal (CHRD ; jaune) sont illustrés. Les résidus sulfatés (SO₄ ; Y38 et Y142), phosphorylés (PO₄ ; S47 et Y142) et glycozylé (CHO ; N533) sont représentés. Les résidus de la triade catalytique soient D186 (D), H226 (H), S386 (S) et l'oxanion N317 (N) sont affichés. (b) Structure du complexe PCSK9•LDLR extrapolée à partir du co-cristal PCSK9•EGF-A (à partir de MacPymol ; PDB 1N7D et 3BPS).^{78, 243} (c-d) Immunobuvardage et immunohistochimie du LDLR à partir d'extraits protéiques ou de coupe de foie de souris de type sauvage (+/+), surexprimant (Tg⁺) ou déficiente pour PCSK9 (-/-). À noter que l'expression résiduelle du LDLR dans le foie de souris surexprimant PCSK9 (Tg⁺) est comparable à celui de souris LDLR-déficiente (LDLR^{-/-}). (e) profile HPLC illustrant la distribution du cholestérol plasmatique dans les différentes fractions (VLDL, LDL et HDL) pour les souris de type sauvage (+/+ ; blanche) et PCSK9-déficiente (-/- ; noire).

(Source: Modifiée de Seidah NG.²³⁷, Kwon HJ et coll.²⁴³ et Zaid A et coll.¹³⁹)

Il fut aussi proposé que la PCSK9 formerait un complexe multimérique en s'associant avec elle-même en fonction du pH, de sa concentration et de la température.²⁵² Un certain assemblage de PCSK9 serait favorable à une dégradation plus accrue du LDLR. De plus, il fut avancé que la queue cytosolique du LDLR, importante pour l'endocytose du récepteur, ne serait pas nécessaire dans la dégradation induite par l'ajout de PCSK9 exogène (milieu extracellulaire).^{253, 254} En somme, on peut conclure que PCSK9 lie directement le LDLR (plus fortement à pH acide), favorise la dégradation du récepteur dans des compartiments acides (endosomes tardifs/lysosomes, en aval du RE) où son action peut être neutralisé par l'ajout d'un agent alcalinisant et ne semble pas impliquer le protéasome. Jusqu'à maintenant, les observations ont plutôt mené à des relations du type cause à effet. Bien que plusieurs paramètres aient été mis de l'avant, il reste encore bien des pièces à combler pour bien comprendre le mécanisme par lequel PCSK9 induit la dégradation du LDLR.

1.7.3 Contribution du trafic extra- *versus* intracellulaire

Une partie de l'élément de réponse réside dans l'étude du trafic de PCSK9 et du LDLR dans la cellule. Plusieurs évidences ont montré que l'induction de la dégradation du LDLR par PCSK9 pouvait se faire soit de manière intra- ou extracellulaire.^{140, 239} Afin de bien cerner les deux voies impliquées, il est important de redéfinir certains concepts du trafic vésiculaire. Les vésicules de clathrine sont des assemblages sphériques bien précis qui ont pour fonction de transporter des protéines à l'intérieur de la cellule.²⁵⁵ Les molécules de clathrine (chaînes lourdes et légères) forment des structures sphériques qui prennent naissance soit à partir du RTG (réseau *trans*-golgi) ou de la surface membranaire. À la membrane plasmique des hépatocytes, le recrutement du LDLR dans les vésicules de clathrine dépend essentiellement du motif peptidique NPXY, présent dans la queue cytosolique du récepteur.²⁵⁶⁻²⁵⁸ L'entrée d'un cargo (*e.g.* LDLR) dans les vésicules en formation implique d'autres facteurs dont les protéines adaptatrice de clathrine (*clathrin*

adaptor protein; AP). Les APs (AP-1A, AP1-B, AP-2, AP-3A AP-3B et AP-4) sont des complexes tétramériques liant d'un côté la clathrine et de l'autre la queue cytosolique d'un cargo selon des motifs spécifiques.^{259, 260} Le complexe AP-2 est impliqué dans l'endocytose de récepteurs à partir de la membrane plasmique vers les endosomes, AP-1A, AP-3 et AP-4 dans le transport du RTG vers les endosomes tardifs et AP-1B engagé dans le trafic du RTG vers la membrane basolatérale de cellules polarisées. Il fut montré que la clathrine et AP-1B sont importants pour le transport polarisé du LDLR à la membrane basolatérale.^{261, 262} La présence des protéines cytosoliques AP-2 et ARH (Chapitre I.1.5.3), liant directement le LDLR et la clathrine, sont des participants impératifs pour l'internalisation du récepteur.^{118-122, 263} Il est important de rappeler que l'ARH est une petite protéine cytosolique qui fut associée à l'hypercholestérolémie familiale de type récessive (Chapitre I.1.5.3). L'absence d'ARH fonctionnel affecte directement l'endocytose du LDLR dans les hépatocytes causant une accumulation de particules LDL dans la circulation sanguine.

Une des premières évidences que la dégradation du LDLR induite par PCSK9 nécessite un transport vésiculaire provient de l'observation que l'absence de chaîne lourde de clathrine bloque l'effet de PCSK9 sur le récepteur.¹⁷⁸ Il est important de noter que les transports vésiculaires provenant du RTG ou de la membrane plasmique vers les endosomes sont affectés par ce type de traitement. À l'aide de cultures primaires d'hépatocytes déficients pour la protéine ARH (*Arh*^{-/-}; endocytose du LDLR non-fonctionnel), l'ajout de PCSK9 exogène (extracellulaire) n'a présenté aucun effet sur la dégradation du LDLR.²³⁹ Par contre, le LDLR est sensible à PCSK9 lorsque celle-ci fut surexprimée dans le foie de souris *Arh*^{-/-}.¹⁴⁰ Il est donc convenu qu'il existe deux voies possibles de dégradation du LDLR par PCSK9 soit extracellulaire (ARH-dépendant) et intracellulaire (ARH-indépendant). Fait intéressant, dans les hépatocytes *Arh*^{-/-} exprimant de manière endogène PCSK9, aucune augmentation au niveau protéique ne fut observée pour le LDLR bien que l'absence de cette protéine empêche l'internalisation du récepteur.¹¹⁹ Il est donc possible que dans un contexte endogène, PCSK9 pourrait induire la dégradation du LDLR par la voie intracellulaire.

1.7.4 Stratégies d'inhibition de la PCSK9

Il est maintenant indéniable que PCSK9 soit devenue la cible thérapeutique de premier choix pour contrer l'hypercholestérolémie familiale et prévenir les maladies cardiovasculaires. Un éditorial publié dans la revue *Science*, par les chercheurs Brown et Goldstein, a souligné que la découverte de PCSK9 apporte un potentiel réducteur puissant du cholestérol sanguin où une réduction à long terme serait d'autant plus bénéfique.¹³⁵ Dans la population, on estime à 1:500 le nombre de patients hypercholestérolémiques ayant des mutations majoritairement associées à une perte de fonction du LDLR (plus souvent sous forme hétérozygote).¹¹³ Ces patients sont traités avec des statines qui ont montré de bons résultats quant à la réduction de la *néo*-synthèse du cholestérol. L'utilisation d'un éventuel inhibiteur de PCSK9 avec ou sans statines pour être extrêmement avantageux pour les patients qui présente qu'un allèle fonctionnel pour le LDL récepteur. De plus, l'emploi synergique d'une statine avec un inhibiteur de PCSK9 réduirait la production de cholestérol et augmenterait la clairance des particules LDL-cholestérol par l'entremise d'une dégradation réduite du LDLR.¹³⁸

Plusieurs équipes, dont de nombreuses compagnies pharmaceutiques, ont développé des outils pour inhiber PCSK9. Chez la souris et les primates, il fut démontré que l'injection d'oligonucléotides interférant avec l'expression de PCSK9 (RNAi) réduit de manière rapide et remarquable les niveaux de LDL-cholestérol par l'entremise du LDL récepteur.²⁶⁴ Plus récemment, l'utilisation de LNAs (*locked nucleic acid*) contre PCSK9 comme approche d'atténuation génique a montré des résultats similaires.²⁶⁵ D'autres groupes ont plutôt optés pour l'utilisation d'anticorps dirigés contre le domaine d'interaction PCSK9•EGFA(LDLR) comme approche thérapeutique où les niveaux de cholestérol furent aussi réduit considérablement.²⁶⁶ Par peptidomimétique, il fut aussi possible de bloquer l'action de PCSK9 sur le LDLR endogène avec un excès du peptide EGF-A purifié (domaine du LDLR interagissant avec PCSK9).²⁶⁷ De plus, le mutant

H306Y (présent dans l'EGF-A), qui lie plus efficacement PCSK9, a montré un pouvoir inhibiteur accru sur la dégradation du LDLR induite par PCSK9.^{244, 245} Il est sans aucun doute que nous verrons très prochainement l'apparition d'un inhibiteur de PCSK9 dans la prévention des maladies cardiovasculaires.

Chapitre II: Article 1

Titre : *The Proprotein Convertase PCSK9 Induces the Degradation of Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) and Its Closest Family Members VLDLR and ApoER2*

Auteurs : Steve Poirier, Gaétan Mayer, Suzanne Benjannet, Éric Bergeron, Jadwiga Marcinkiewicz, Nasha Nassoury, Harald Mayer, Johannes Nimpf, Annik Prat et Nabil G. Seidah.

Journal : *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, No. 4, pp. 2363-2372.

Contribution : conceptualisation (65%); optimisation et expérimentation (80%); rédaction (50%)

Pertinence

Notre laboratoire avait préalablement observé que, lors du développement embryonnaire, PCSK9 est exprimée de manière transitoire dans des centres à forte activité neurogénique tels le télencéphale, le cervelet et le bulbe olfactif.¹²⁶ À l'aide du modèle de cellules embryonnaires P19, nous avons ensuite dénoté qu'il existe une corrélation directe entre l'activité transcriptionnelle de PCSK9 et la différenciation neuronale et ce, de manière indépendante à la régulation des gènes cholestérogéniques.¹⁸⁷ De plus, l'atténuation génique de PCSK9 chez le poisson-zèbre a occasionné une létalité embryonnaire due principalement à un désordre sévère du système nerveux central. En accord avec ces observations, nous nous sommes donc intéressés aux récepteurs ApoER2 et VLDLR, qui possèdent une forte homologie structurale avec le LDLR (*voir* Fig. 18; Annexe 2).²⁶⁸ Chez la souris, il fut démontré que l'absence de ces deux récepteurs cause aussi un désordre neurologique principalement causé par une désorganisation des couches neuronales du cortex, du cervelet et du bulbe olfactif.²⁶⁹

Cet article a donc été le premier à mettre en évidence que PCSK9 affecte d'autres cibles que le LDLR soit les récepteurs ApoER2 et VLDLR. Ces résultats furent ensuite confirmés par deux compagnies pharmaceutiques soit Schering-Plough et Merck.^{267, 270} En utilisant un modèle cellulaire unique et représentatif développé par l'équipe du Dr. Nimpf²⁷¹, nous avons montré que PCSK9 induit aussi la dégradation de ces récepteurs ouvrant la voie à d'autres effets possible de cette convertase. Ces travaux ont suscité beaucoup d'intérêt par la communauté scientifique faisant l'objet d'une présentation orale lors du prestigieux congrès de l'*American Heart Association* en Novembre 2007.²⁷²



Title: The Proprotein Convertase PCSK9 Induces the Degradation of Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) and Its Closest Family Members VLDLR and ApoER2

Author: Steve Poirier, Gaetan Mayer, Suzanne Benjannet, Eric Bergeron, Jadwiga Marcinkiewicz, Nasha Nassoury, Harald Mayer, Johannes Nimpf, Annik Prat, Nabil G. Seidah

Publication: Journal of Biological Chemistry

Publisher: The American Society for Biochemistry and Molecular Biology

Date: Jan 25, 2008

Copyright © 2008, by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology

Logged in as:
Steve Poirier

LOGOUT

Non-profit/Non-commercial Use

For **Non-profit/Non-commercial** uses: You are free to copy, distribute, transmit and to adapt the work under the following conditions:

Attribution. You must attribute the work in the manner specified by the author or licensor (but not in any way that suggests that they endorse you or your use of the work).

Non-commercial. You may not use the work for commercial purposes; including original authors reusing content by a commercial publisher.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2010 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#)
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

**THE PROPROTEIN CONVERTASE PCSK9 INDUCES THE DEGRADATION OF
LDLR AND ITS CLOSEST FAMILY MEMBERS VLDLR AND APOER2**

**Steve Poirier‡, Gaetan Mayer‡, Suzanne Benjannet‡, Eric Bergeron‡, Jadwiga
Marcinkiewicz‡, Nasha Nassoury‡, Harald Mayer§, Johannes Nimpf§, Annik Prat‡
and Nabil G. Seidah‡¶**

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

§ Max F. Perutz Laboratories, Department of Medical Biochemistry, Medical University of
Vienna, Vienna, Austria.

Running title: PCSK9 enhances the degradation of VLDLR and ApoER2

¶ Address correspondence to: Nabil G. Seidah: Laboratory of Biochemical
Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Avenue West
Montreal, QC H2W 1R7, Canada. Tel: (514) 987-5609; Fax: (514) 987-5542

The proprotein convertase PCSK9 gene is the third locus implicated in familial hypercholesterolemia, emphasizing its role in cardiovascular diseases. Loss of function mutations and gene disruption of PCSK9 resulted in a higher clearance of plasma low density lipoprotein cholesterol, likely due to a reduced degradation of the liver LDL receptor (LDLR). In this study, we show that two of the closest family members to LDLR are also PCSK9 targets. These include the very-low-density-lipoprotein receptor (VLDLR) and apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2) implicated in neuronal development and lipid metabolism. Our results show that wild type PCSK9 and more so its natural gain of function mutant D374Y can efficiently degrade the LDLR, VLDLR and ApoER2 either following cellular co-expression or re-internalization of secreted human PCSK9. Such PCSK9-induced degradation does not require its catalytic activity. Membrane-bound PCSK9-chimeras enhanced the intracellular

targeting of PCSK9 to late endosomes/lysosomes and resulted in a much more efficient degradation of the three receptors. We also demonstrate that the activity of PCSK9 and its binding affinity on VLDLR and ApoER2 does not depend on the presence of LDLR. Finally, in situ hybridization show close localization of PCSK9 mRNA expression to that of VLDLR in mouse post natal day 1 cerebellum. Thus, this study demonstrates a more general effect of PCSK9 on the degradation of the LDLR family that emphasizes its major role in cholesterol and lipid homeostasis as well as brain development.

2.1. INTRODUCTION

Familial hypercholesterolemia (FH) is mainly characterized by elevated plasma LDL-cholesterol that is highly correlated with cardiovascular diseases (1). The main player in regulating the circulating cholesterol is the low density lipoprotein receptor (LDLR), which is expressed mostly in the liver. Recently, natural mutations in the proprotein convertase PCSK9 (2;3) have been identified and associated with the third locus implicated in FH (4-6). The major function of PCSK9 seems to be an enhancement of the degradation of the LDLR (7;8) in acidic subcellular compartments (3), likely endosomes/lysosomes (9;10). This can occur either via an extracellular endocytotic route (11), or possibly by a direct cellular circuit not involving cell-surface endocytosis of the LDLR (12). The gain of function PCSK9 mutation D374Y (13;14) or D374H (15) have the highest impact on the development of hypercholesterolemia (16), likely through enhanced binding (17) and degradation of the LDLR (18;19). The major binding site of LDLR to PCSK9 seems to reside within its first epidermal growth factor-like repeat namely EGF-A. (20). Finally, it was recently suggested that the PCSK9-induced degradation of the cell-surface LDLR does not require its proteolytic activity (21).

One of the unanswered questions is the target specificity of PCSK9, and it is not known, nor obvious, whether other members of the LDLR family are also affected by

PCSK9. This family consists of structurally closely related transmembrane proteins: LRP1, LRP1b, megalin/LRP2, LDLR, very low-density lipoprotein receptor (VLDLR), MEGF7/LRP4, LRP8/apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2) (22). Earlier studies revealed that LRP1 is not degraded by PCSK9 (3;12). However, since primary sequence alignment revealed that the closest structural members to LDLR are VLDLR (59% identity) and ApoER2 (46% identity) (supplemental Fig. S1), we tested the potential degradation activity of PCSK9 on these two receptors.

Our data demonstrate that wild type PCSK9, and more so its natural mutant D374Y, enhance the degradation of VLDLR and ApoER2 in an LDLR- and catalytic activity-independent manner. Furthermore, the expression of either ApoER2 or VLDLR in CHO-A7 cells lacking endogenous LDLR enhanced the cellular association of exogenous PCSK9. Finally, we show that intracellular targeting of membrane-bound PCSK9 chimera accentuates their activity on the three receptors.

2.2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

Sequence alignment – As shown in Fig.S1, the full length sequence of ApoER2 (NP_150643), VLDLR (NP_003374) and LDLR (NP_000518) were aligned using the Multalin (23) and Genedoc software (National Resource for Biomedical Supercomputing; <http://www.nrbsc.org>).

cDNAs and cells – Human PCSK9 and its mutant cDNAs were cloned into pIRES2-EGFP (Clontech) with or without a C-terminal V5 tag as described (4). The plasmids encoding for the ApoER2 and VLDLR were reported in (24). HEK293, Neuro2A, CHO-K1 and hepatic HepG2 cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA) and HuH7 cells (a gift from François Jean, University of British Columbia) were routinely cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium plus 10% fetal bovine serum. CHO-A7 (IdlA7; lacking the LDLR) and its parent CHO-wt were maintained in Ham's F12 medium supplemented with 10% FBS (Gibco) (25). These cells were also stably transfected with

either cDNAs of empty vector pcDNA3, or recombinants of VLDLR and ApoER2. Stable pools (DNA3-A7; VLDLR-A7 and ApoER2-A7) were isolated by G418 (600 µg/ml) selection. The stable murine fibroblasts NIH 3T3 cells that express the cytoplasmic Dab1 protein and either ApoER2 (A+/D) or VLDLR (V-/D) were described in (24). Briefly, 3T3 cells were sequentially selected for expression of Dab1 (D) and for ApoER2 having the proline-rich cytoplasmic insert (A+) or for VLDLR (V-) that lack the o-glycosylation site. The cells containing a puromycin resistance were maintained at a concentration of 0.75 µg/ml.

Conditioned media – HEK293 cells were transfected using effectene transfection reagent (Qiagen) and were kept for 24h in serum-depleted media. The conditioned media were then transferred to 3T3 cells 6h or 24h prior to analyses. For immunocytochemistry detection of the re-internalization assay, a final concentration of 10 µM NH₄Cl was added to the conditioned media.

Biosynthetic analysis – HEK293 cells (2-4 x 10⁵) in 60 mm dishes were transiently transfected using Effectene (Qiagen) with 1.2 µg of either wild type PCSK9-V5 (WT), PCSK9-V5-[TM-CT-Lamp1] (L1), PCSK9-V5-[TM-CT-LDLR] (LDLR), PCSK9-V5-[TM-CT-ACE2] (ACE2), or pIRES2 empty vector control (Ctl) in the presence or absence of co-transfected hLDLR cDNA. Two days post transfection the cells were washed and pulse-labeled with 400 µCi/ml [³⁵S]Met+Cys (GE Healthcare) for 4h (26). The cell lysates were immunoprecipitated with mAb:V5 (1:500) in buffer containing 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.5% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate and a mixture of protease inhibitors (Roche Molecular Biochemicals) (3). The immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE on 8% Tricine gels, dried and autoradiographed as described (27).

Western blot analysis – Cells were washed three times in PBS and lysed in RIPA buffer [50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1% (v/v) Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 150

mM NaCl and 0.1% (v/v) sodium dodecyl sulfate (SDS)] with a Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science). Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (8% gels) and blotted on HyBond nitrocellulose membranes (GE Healthcare) which were blocked for 1h in TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) containing 10% non-fat dry milk. Afterwards, membranes were incubated overnight in 5% non-fat milk with the respective antibodies (Ab): ApoER2 (a23; 1:3000; (28), VLDLR (a74; 1:2000; (29), LDLR (1:5000, Abcam), PCSK9 (1:3000; (10), HGFR (1:1000; SantaCruz), ACE-2 (1:2000; R&D systems), Lamp1 (1:2000; (30) and β -actin (1:3000; Sigma-Aldrich). Appropriate horseradish peroxidase-conjugated antibodies (1:10,000; Sigma-Aldrich) were used for detection with enhanced chemiluminescence using ECL plus kit (GE Healthcare).

Immunofluorescence and confocal microscopy – At 48h post-transfection, the cells were sequentially washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100/PBS for 10 min and incubated with 150 mM glycine to stabilize the aldehyde. The cells were then incubated for 30 min with 1% BSA (Bovine serum albumin; Fraction V, Sigma-Aldrich) containing 0.1% Triton X-100, followed by overnight incubation at 4°C with rabbit polyconal antibodies Ab:PCSK9 (1:1000), Ab:VLDLR (a74; 1:200), Ab:ApoER2 (a23; 1:200) and monoclonal Ab:V5 (1:1000; Invitrogen) in blocking solution with or without the late endosomes marker Ab:CI-MPR (cation-independent mannose-6-phosphate receptor (CI-MPR, 1:500, Abcam). Afterwards, the cells were incubated for 60 min with Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-rabbit IgG and with Alexa Fluor 555-conjugated goat anti-mouse IgG (both at 10 μ g/ml; Molecular Probes) and mounted in 90% glycerol + 1% 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO, Sigma-Aldrich). Immunofluorescence analyses were performed with a Zeiss LSM-510 confocal microscope coupled with a Nikon Eclipse TE2000-U laser-scanning microscope with 408, 488, and 543-nm laser lines. Images were processed with Adobe Photoshop CS2, version 9.0 (Adobe Systems).

In situ hybridization (ISH) in mouse – For ISH, mouse sense and antisense cRNA probes coding for mouse PCSK9 [nts. 1197-2090, accession # NM_153565] (2) and mouse VLDLR [nts 1193-2803; accession # NM_013703] or ApoER2 [nts.2320-3030; accession # NM_004631] were labeled with [35S]UTP and [35S]CTP (1,250 Ci/mmol; Amersham), to obtain high specific activities of ~1000 Ci/mmol. Eight to ten μm whole mouse cryosections obtained at day 1 after birth (P1) were fixed for 1h in 4% formaldehyde and hybridized overnight at 55°C as described (31). For autoradiography, the sections were dipped in photographic emulsion (NTB-2, Kodak), exposed for 6-12 days, developed in D19 solution (Kodak), and stained with hematoxylin and Eosin.

2.3. RESULTS

VLDLR and ApoER2 are novel PCSK9 targets – While LRP1 exhibits a 40% identity to LDLR (3;12), it was not degraded by wild type PCSK9 or its gain of function mutant S127R (3). Since the primary sequences of ApoER2 and VLDLR exhibit the highest identity and similarity to that of LDLR (46% & 49% and 59% & 65%; supplemental Fig. S1), it was of interest to assess whether PCSK9 may also enhance the degradation of these receptors. In order to test this hypothesis, HEK293 cells were transiently co-transfected with cDNAs encoding ApoER2, VLDLR and LDLR either with an empty vector (pIRES; Ctl) or wild type PCSK9 (Fig. 1A). Twenty-four hours later, we analyzed by Western blot the steady state levels of each receptor in total cell lysates. Clearly, as for the LDLR, the presence of PCSK9 resulted in a substantial decrease in the protein levels of both ApoER2 and VLDLR. As control, PCSK9 did not affect the amount of a transmembrane protein angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) suggesting that the three receptors may share a common specific motif that is not present in ACE-2.

We then extended our observations by co-transfecting NIH 3T3 fibroblasts with VLDLR or ApoER2 either with an empty vector (Ctl) or with recombinant PCSK9. The data revealed that as in HEK293 cells, PCSK9 enhances the degradation of both ApoER2

and VLDLR, the levels of which were normalized by an internal protein standard, namely lissencephaly (Lis1; Fig. 1B) (32). It was recently reported that PCSK9 enhances the degradation of LDLR both intracellularly (12;33) and via re-uptake of the secreted protein (11;18). Accordingly, we tested whether addition of PCSK9 extracellularly to cells expressing VLDLR or ApoER2 had the same effect as that reported for LDLR. As the endogenous expression of these receptors is usually low in most cell lines, we opted to use mouse NIH 3T3 fibroblasts stably expressing either receptor, as well as their cytosolic adaptor protein Dab1 (24). We incubated overnight the respective stable cell lines with conditioned media of HEK293 cells expressing either an empty vector (-) or wild type PCSK9 (+). Again, the results show that exogenous PCSK9 induces the intracellular degradation of VLDLR and ApoER2 (Fig. 1C). Thus, similar to its effect on LDLR (3;7;9;12;19), PCSK9 also enhances the degradation of ApoER2 and VLDLR both by co-expression or by its cell-surface internalization.

Catalytic activity of PCSK9 is not required for LDLR, ApoER2 and VLDLR degradation – Like other proprotein convertases (PCs), PCSK9 is synthesized as an inactive zymogen (proPCSK9) in the endoplasmic reticulum (2). Using its catalytic triad (Asp186, His226 and Ser386), proPCSK9 undergoes an intramolecular autocatalytic cleavage resulting in a heterodimeric complex of its prosegment (proPC9; aa 31-152) and the rest of the molecule (Δ pro-PC9; aa 153-692), which then traffics through the secretory pathway (2). It was recently shown that HepG2 cells incubated with an active site mutant of PCSK9 obtained via co-expression of the prosegment together with a PCSK9 construct lacking the prosegment (either wild type or the D374Y mutant) resulted in a fully active heterodimer that can reduce the steady state levels of LDLR, independent from its catalytic activity (21). We thus examined whether the activity of PCSK9 was necessary for the degradation of ApoER2 and VLDLR.

Using HEK293 cells, we first showed that similar levels of secreted PCSK9 were found in the media of cells expressing either in trans wild-type PCSK9 (proPC9 +

Δ proPC9-wt; t-PCSK9-wt) and full-length PCSK9 (PCSK9-wt; Fig. 2A, bottom). Upon co-expression with ApoER2, VLDLR or LDLR, both PCSK9 constructs are able to degrade the three receptors (Fig. 2A). Since the high binding affinity of the D374Y mutant seems to be independent of its catalytic activity (21), we co-expressed in trans an inactive site mutant version of the D374Y (t-PCSK9-H226A/D374Y, Fig. 2A). Clearly, the co-expression of t-PCSK9-H226A/D374Y with ApoER2, VLDLR or LDLR in HEK293 cells showed similar enhanced degradation activity as compared to the trans-expression of the catalytically active D374Y (t-PCSK9-D374Y) and the full-length form (PCSK9-D374Y; Fig. 2A). Thus, our data suggest that as for the LDLR, the catalytic activity of PCSK9 is not required for the degradation of either ApoER2 or VLDLR.

Using HuH7 cells, we then decided to study the subcellular localization of trans-expressed wild-type PCSK9 (t-PCSK9-wt, Fig. 2). We first expressed in HuH7 cells the full-length PCSK9-wt and its natural mutant PCSK9-D374Y. Our confocal microscopy analyses show that both constructs (PCSK9-wt, PCSK9-D374Y; Fig. 2B; red) are present in the late-endosomes/lysosomes compartment based on their co-localization with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor marker (CI-MPR; Fig. 2B; blue). We then expressed in trans V5-proPC9 with Δ proPC9-wt and show that both molecules co-localized in specific compartments within the cells in a similar fashion to PCSK9 (V5 and PCSK9 immunoreactivity), likely representing late-endosomes/lysosomes. In fact, our data suggest that as compared to the full-length PCSK9, trans-expression (proPC9 + Δ proPC9-wt) resulted in a similar subcellular localization and degradation function on the three receptors, in a PCSK9 catalytic activity-independent fashion.

PCSK9 enhances the degradation of ApoER2 and VLDLR in an LDLR-independent fashion – In order to test whether the presence of LDLR is necessary for the observed PCSK9 activity on ApoER2 or VLDLR, we made use of Id1A7 cells that lack expression of endogenous LDLR (herein called CHO-A7 cells) (25). The cDNAs of each receptor were

co-expressed with that of a control empty pIRES vector (Ctl), PCSK9 or its D374Y mutant. Western blot analyses (Fig. 3A) revealed that PCSK9 and its D374Y mutant are similarly active in the absence of LDLR. This implies that the over-expressed PCSK9-induced degradation of ApoER2 and VLDLR is independent of the presence of LDLR.

In order to study the binding affinity of PCSK9 on either ApoER2 or VLDLR and to define whether if the effect of exogenous PCSK9 on these receptors is also independent of LDLR, we generated CHO-A7 pools that stably express either an empty vector (DNA3-A7), ApoER2 (ApoER2-A7) or VLDLR (VLDLR-A7). We then incubated overnight these cells with media obtained from HEK293 cells transiently transfected either with empty vector (Ctl), PCSK9 or its D374Y mutant (Fig. 3B). Following extensive washes with PBS, Western blot analyses of duplicate cell lysates revealed that the presence of ApoER2 (Fig. 3C) or VLDLR (Fig. 3D) clearly enhanced the ability of exogenous PCSK9, and more so its D374Y mutant, to be associated with CHO-A7 cells. While under these conditions extracellular PCSK9-wt has no effect on either receptor, exogenous PCSK9-D374Y is able to partially reduce the levels of ApoER2 and more so VLDLR, even though similar amounts were associated with both cells.

Since the degradation of ApoER2 and VLDLR by co-expressed PCSK9 is LDLR-independent, we then addressed the question if the LDLR could be limiting for ApoER2 and VLDLR degradation by exogenous PCSK9. For this purpose, we transiently expressed an empty vector or recombinant human LDLR in our CHO-A7 stable cell lines (DNA3-A7, ApoER2-A7, VLDLR-A7, Fig. 4). Twenty-four hours post-transfection, cells were incubated overnight with a conditioned media derived from HEK293 cells transiently expressing either an empty vector (Ctl), PCSK9-wt or PCSK9-D374Y (Fig. 4A). Clearly, in all cell lines, exogenous PCSK9-wt and its D374Y mutant resulted in efficient degradation of the transfected LDLR independent from the presence of either ApoER2 or VLDLR (Fig. 4B-D). Our results also suggested that LDLR expression seems to compete for VLDLR degradation by PCSK9 with little or no effect on ApoER2 (Fig. 4C-D).

Interestingly, when compared to DNA3-A7 expressing cells (Fig. 4B, bottom), the expression of both LDLR with either ApoER2 (Fig. 4C) or VLDLR (Fig. 4D) markedly increases the cellular association of exogenous PCSK9. This suggests that together with the LDLR, ApoER2 and VLDLR resulted in an additive binding affinity for PCSK9.

Thus, LDLR does not seem to be necessary for PCSK9 to enhance the degradation of VLDLR or ApoER2 and the latter increase the cellular association of exogenous PCSK9. However, the degradation activity of exogenous PCSK9 on ApoER2 or VLDLR seems to be limiting in CHO-A7 cells. This may reflect the need for other cellular factor(s) regulating endocytosis of these receptors, possibly absent, or present at low levels. An example would be the protein Dab1 that binds the cytosolic tails of both VLDLR and ApoER2 (24), which is the equivalent to ARH for the LDLR that as been shown to be essential for its degradation by exogenous PCSK9 (11).

The cytosolic adaptor protein Dab1 markedly increases the degradation activity of exogenous PCSK9 on ApoER2 and VLDLR – To reinforce the above conclusion, we took advantage of NIH 3T3 cells that were stably selected for their Dab1 expression together with either ApoER2 (A+/D) or VLDLR (V-/D) (24). Using these cell lines, we then decided to compare the efficacy of PCSK9 to enhance the degradation of the three receptors versus its gain of function mutant D374Y (13;14;16), which is known to degrade (18;19) and bind (17) LDLR, ApoER2 and VLDLR much more efficiently. Western blot analyses using our PCSK9 antibody (10) revealed that the expression and secretion levels of both untagged PCSK9 and its D374Y mutant are similar in transiently transfected HEK293 cells (Fig. 5A). We then used these conditioned media as a source of PCSK9 as compared to control media (Ctl) obtained from HEK293 cells transiently transfected with an empty pIRES vector. Accordingly, NIH 3T3 cells stably expressing the adaptor protein Dab1 and either ApoER2 or VLDLR (24) were incubated with spent media for either 6h or 24h, and the levels of the receptors in the respective lysates were analyzed by Western blot (Fig. 5B). The data show that the levels of ApoER2 and VLDLR are already reduced at 6h

by PCSK9 (36% and 50%) and more so by its D374Y mutant (66% and 72%), respectively. In the VLDLR expressing cells, at 6h the levels of endogenous LDLR were also decreased by PCSK9 and its D374Y mutant (27% and 46%). The decreased levels of ApoER2, VLDLR and LDLR were much more evident at 24h post-incubation, revealing a decrease of 43%, 43% and 50% by PCSK9 and 84%, 89% and 70% by the D374Y mutant, respectively. These data demonstrate that in NIH 3T3 cells both PCSK9 and its D374Y mutant effectively enhance the degradation of all three receptors, albeit with different efficiencies, with the VLDLR seemingly being the most susceptible to exogenous PCSK9-activity.

Internalized PCSK9 co-localizes with ApoER2 and VLDLR – In order to define the cellular localization of the internalized PCSK9, we incubated the stable NIH 3T3 cells (ApoER2, NIH 3T3 A+/D; VLDLR, NIH 3T3 V-/D) with conditioned media provided by HEK293 cells expressing either an empty vector (pIRES-V5) or recombinant PCSK9-V5 (Fig. 6). To prevent degradation of the receptors in the acidic endosomes/ lysosomes (10), we incubated the NIH 3T3 cells with conditioned media containing both PCSK9 and 10 mM of the alkalinizing agent NH₄Cl, which was previously shown to block the PCSK9-induced degradation of the LDLR (3). Clearly, internalized PCSK9 co-localizes with both ApoER2 (Fig. 6A) and VLDLR (Fig. 6B) in perinuclear and punctate structures, reminiscent of those observed with the LDLR (3). Thus, the exogenous PCSK9-induced receptor degradation observed in NIH 3T3 cells expressing either VLDLR or ApoER2 (Fig. 5B) may occur intracellularly and that the cytosolic adaptor Dab1 seems to play a major role in this process, as for ARH that was reported to be important for LDLR degradation by PCSK9 (11).

Membrane-bound PCSK9 chimeras are more effective in enhancing the degradation of ApoER2, VLDLR and LDLR in acidic compartments – We previously reported that C-terminal fusion of proteins to the transmembrane-cytosolic tail of the lysosomal-associated membrane protein Lamp1 results in direct sorting of the tagged protein towards endosomal/

lysosomal compartments (10;30;34). This approach led to the realization that such chimeras could drag partner proteins towards the endosomal/lysosomal degradation pathway. For example, expression of integrin β 3-Lamp1 or tissue inhibitor of metalloproteases TIMP-2-Lamp1 resulted in the degradation of integrins α v/ α 5 (30) or the proprotein convertase PC5 (34), respectively. The data presented in Fig. 5B showed that only a small percentage (<1%) of extracellular PCSK9 actually re-enters the cells and those in Fig. 6 suggested that cytosolic proteins may be necessary for efficient endocytosis and degradation of the receptors by exogenous PCSK9. We thus hypothesized that a chimera of PCSK9 that can no longer exit from the cell, but that effectively sorts to endosomes/lysosomes might be an efficient carrier of its partner proteins LDLR, ApoER2 and VLDLR into these degradation compartments. Accordingly, we designed three type-I membrane-bound PCSK9-V5 chimeras containing at their C-terminus the transmembrane-cytosolic tail of either Lamp1, LDLR, or ACE-2 (35) (Fig. 7A). We then tested the efficacy of each chimera in enhancing the degradation of the LDLR by biosynthetic analysis in HEK293 cells co-transfected with PCSK9 or its chimeras in the presence (+) or absence (-) of LDLR (Fig. 7B, Cells top). The data show that all three membrane-bound PCSK9-chimeras drastically enhance the ability of PCSK9 to increase the intracellular degradation of LDLR, with the Lamp1 and ACE-2 chimera being the most effective. We also noted a drastic decrease in the shedding of the membrane-bound PCSK9 into the media (Fig. 7B, Media in lower panel) and that the metalloprotease-induced shedding of the LDLR resulting in a secreted soluble form (10) is also mostly prevented in all co-expression situations (Fig. 7B, Media in top panel).

Immunocytochemical analysis of HuH7 cells transiently transfected with the above three chimeras, clearly showed that PCSK9 resulting from each construct can enter endosomes/lysosomes, as evidenced by its co-localization with the late endosomes/lysosomes marker CI-MPR (10) (Fig. S2). Note that the cell-surface localization of PCSK9-ACE-2 and PCSK9-LDLR is much more evident than that of PCSK9-L1, which is more present in the degradative endosomes/lysosomes. We also analyzed the remaining levels of LDLR by cell fluorescence-activated cellular sorting (FACS) analyses, and found

that the PCSK9-L1 chimera is much more effective in reducing the cell surface LDLR in HuH7 as compared secreted PCSK9-wt or to other chimeras (not shown).

Cellular studies on Lamp1 revealed that the protein is mostly directed towards endosomes/lysosomes upon exit from the trans Golgi network (TGN), that only a small percentage transiently cycles to the cell surface, and that the sorting signal resides in its 11 amino acid-long cytosolic tail (36). It is known that PCSK9 and LDLR co-localize in endosomes, acidic pH is needed for the degradation of LDLR (3;9), and the PCSK9-LDLR complex is even tighter at acidic pHs (17). We thus reasoned that PCSK9-L1 may primarily function by a direct route from the TGN towards endosomes/ lysosomes and that its effect on LDLR may also be abrogated at neutral pHs. Indeed, incubation of HuH7 cells with 10 mM NH₄Cl markedly diminished the effect of either PCSK9 or PCSK9-L1 on endogenous LDLR (Fig. 8A). This is in accord with the localization of PCSK9 with endogenous LDLR in early and late endosomes of HuH7 cells (10). As controls, we show that PCSK9 or PCSK9-L1 do not affect the levels of endogenous hepatocyte growth factor receptor (HGFR). Furthermore, another chimera integrin β 3-Lamp1 (β 3-L1) (30) did not affect the levels of LDLR in absence or presence of NH₄Cl (Fig. 8A). Immunocytochemical analysis at the confocal level revealed that in the presence of 10 mM NH₄Cl and compared to over-expressed PCSK9, the chimeric PCSK9-L1 completely co-localizes with the CI-MPR (Fig. 8B) (10). Thus, the enhanced activity of PCSK9-L1 correlates with its ability to efficiently sort to endosomes/lysosomes.

It was reported that PCSK9 induces the degradation of LDLR in a cell-line specific fashion. Thus, while quite active in enhancing the degradation of endogenous LDLR in HepG2 cells, it does not seem to work efficiently on LDLR in CHO cells (12), and PCSK9 degrades endogenous LDLR much more rapidly in HepG2 versus HEK293 cells (37). We thus examined whether PCSK9 and PCSK9-L1 could degrade the three receptors in a cell-specific fashion. We analyzed the effect of these constructs on the level of co-expressed ApoER2, VLDLR and LDLR in Neuro2A, HuH7 and CHO-K1 cells (Fig. 9). The data

show that in CHO-K1, and less so in HuH7 cells, PCSK9 enhances the degradation of VLDLR and ApoER2 with little effect on LDLR. In contrast, PCSK9 does not reduce the level of any of the three receptors in Neuro2A cells. Amazingly, in the three cell lines the chimeric PCSK9-L1 actively enhances the degradation of all three receptors. This suggests that the cell-specific dependence can be bypassed by the efficient intracellular targeting of PCSK9 to endosomes/lysosomes.

In situ hybridization of PCSK9, ApoER2 and VLDLR in whole mouse at post natal day 1 – During mouse development PCSK9 is transiently expressed in the brain in the telencephalon, rostral extension of the olfactory epithelium and in the cerebellum, the latter being quite evident at post-natal day 1 (P1) (2). Functional analysis of ApoER2 and VLDLR demonstrated a partial redundancy and that the knockout of both receptors resulted in disorganization of the layers in brain cortex and cerebellum (38). Post-natally VLDLR is expressed in the cerebellar Purkinje cell layer and the underlying granular layer (39). On dry film, comparative in situ hybridization (ISH) analysis of PCSK9 and either ApoER2 or VLDLR mRNAs in a whole mouse at P1 revealed that PCSK9 expression may localize close to that of VLDLR only in cerebellum and possibly with both receptors in kidney cortex (Fig. 10; left panels). We thus analyzed in more details their expression following emulsion dipping of the slides (Fig. 10; right panels). The data show that at P1, ApoER2 is not substantially expressed in the cerebellum (Fig. 10C,C'; right panels), but PCSK9 is mostly expressed in the external layer of the cerebellum (Fig. 10B,B'; right panels) surrounding the Purkinje cells expressing VLDLR (Fig. 10A,A'; right panels). Thus, this suggests that at P1 secreted cerebellar PCSK9 may affect VLDLR levels via an endocytotic route.

2.4. DISCUSSION

In order to further evaluate the potential activity of the convertase PCSK9 on other members of the LDLR family, we decided to test its ability to enhance the degradation of

ApoER2 and VLDLR, the closest family members to LDLR. Our results demonstrate that, in an LDLR-independent fashion, PCSK9 is able to affect the levels of both receptors either by its co-expression (Fig. 1) or cell-surface internalization (Figs. 3,4) and that its catalytic activity is not required (Fig. 2). We also show that exogenous addition of the gain-of-function D374Y Anglo-Saxon mutant is more active on enhancing the degradation of LDLR, ApoER2 and VLDLR (Fig. 5B). Using CHO-A7 cells (lacking endogenous LDLR) that stably express either ApoER2 or VLDLR, we demonstrate that the presence of both receptors increases the capacity of PCSK9, and more so of its natural mutant D374Y, to be associated with cells implicating that these receptors may well bind PCSK9 either directly or indirectly (Fig. 3). It was recently reported that the EGF-A domain of LDLR binds directly PCSK9 (20). However, so far the LDLR-binding domain(s) of the secreted complex of PCSK9 and its inhibitory prosegment (2;17) is unknown. The major importance of Asp374 in this interaction, especially when mutated to Tyr (D374Y), suggests that the exposed surface loop containing Asp374 (17) may participate in the interaction of PCSK9 with the LDLR.

A recent report suggested that upon 2h incubation of exogenous PCSK9 with COS-M cells expressing LDLR or VLDLR, only LDLR-expressing cells bound PCSK9 (20). Though no data were presented concerning the PCSK9-induced degradation of LDLR or VLDLR in COS-M cells. In contrast, our data showed that an overnight incubation of exogenous PCSK9, and more so of its D374Y mutant, with CHO-A7 cells stably expressing either ApoER2 or VLDLR, resulted in an enhanced association of PCSK9 with these cells (Fig. 3C,D). Thus, either PCSK9 has a higher affinity (2h vs. overnight incubation) for LDLR versus ApoER2 or VLDLR, or the interaction is cell-type dependant. We observed however, an enhanced degradation of ApoER2 and VLDLR following their co-expression with PCSK9 and/or its chimeric PCSK9-L1 in six different cell types, namely HEK293, NIH 3T3, CHO-A7, CHO-K1, Neuro2A and HuH7 cells. Furthermore, in COS-1 cells we could not demonstrate degradation of these receptors except with PCSK9-L1 (supplemental Fig. S3A). In addition, overnight incubation of exogenous PCSK9 or its

D374Y mutant with COS-1 cells led to cellular association but did not result in the degradation of endogenous LDLR (supplemental Fig. S3B). Thus, we presume that the cell-type dependant efficacy of PCSK9-induced degradation of LDLR, ApoER2 or VLDLR may depend on specific cellular factors, such as ARH for LDLR and Dab1 for ApoER2 and VLDLR (40).

The effective degradation of the three receptors by the chimeric construct PCSK9-L1 clearly demonstrated that an efficient targeting of PCSK9 to the acidic endosomes/lysosomes (Fig. S2) maximizes its induced degrading function, even in CHO-A7 cells (not shown). Thus, independent of the LDLR, PCSK9 interacts with VLDLR and ApoER2 and drags them towards the intracellular degradative pathway.

While knockdown of PCSK9 in zebrafish revealed a dramatic neuronal phenotype (41), this was not observed in either PCSK9 knockout mice (8) or in two women lacking functional PCSK9 (42;43). Thus, it is possible that in mammals another gene may compensate partially for the absence of PCSK9 in brain. Since VLDLR and ApoER2 are known to exert their major effects during brain development (38), we also carefully analyzed the brains of our *Pcsk9*^{-/-} mice and did not observe overt morphological defects (Rousselet, E. et al., unpublished). Since our work suggested that PCSK9 enhances the degradation of ApoER2 and VLDLR, it would be informative however, to test possible developmental defects in mice overexpressing PCSK9 or its D374Y gain of function mutant in the cerebellum.

In conclusion, PCSK9 has now been shown to enhance the degradation of LDLR and its closest family members ApoER2 and VLDLR (this work), but not LRP1 (3). The availability of the membrane-bound powerful PCSK9-chimeras will be very useful to define the panoply of other cellular proteins that could be affected by PCSK9.

FOOTNOTES

The authors are indebted to Josée Hamelin and Marie-Claude Asselin, for their constant precious advice and help. The secretarial assistance of Brigitte Mary is greatly appreciated.

*This work was supported by a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant MOP-36496, by a Canada chair # 201652 and by a private donation from the Strauss Foundation.

The abbreviations used are: PC, proprotein convertase; PCSK9, proprotein convertase subtilisin kexin 9; FH, familial hypercholesterolemia; CT, cytosolic tail; EGF-A, epidermal growth factor-like repeat A; TM, transmembrane domain; LDLR, low density lipoprotein receptor; ApoER2, apolipoprotein E2 receptor; VLDLR, very low density lipoprotein receptor; Lamp1, lysosomal-associated membrane protein 1; ACE-2, angiotensin converting enzyme 2; CI-MPR, cation independent mannose 6-phosphate receptor; WT, wild type; CHO, Chinese hamster ovary; HuH7, Human hepatocytes; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; PBS, phosphate-buffered saline; cDNA, complementary DNA; ISH, in situ hybridization.

2.5. FIGURE LEGENDS

FIG.1. Degradation of ApoER2 and VLDLR by the convertase PCSK9. (A) HEK293 cells were co-transfected with ApoER2, VLDLR and LDLR either an empty vector (Ctl) or PCSK9-wt. Twenty-four hours later, the steady state levels of the receptors were analyzed by Western blot. The transmembrane protein angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) and β -actin are shown as negative and loading controls respectively. (B) Western blot of NIH 3T3 cells transiently co-expressing VLDLR or ApoER2 with either empty vector (Ctl) or PCSK9. (C) Western blot of NIH 3T3 cells stably expressing VLDLR or ApoER2 with the cytosolic adaptor protein Dab1 incubated overnight with conditioned media derived

from transiently transfected HEK293 cells expressing the empty pIRES vector (-) or PCSK9 (+). In (B) and (C) Lis1 was used as an internal protein standard. Similar data were obtained in a separate experiment (not shown).

FIG.2. Catalytic activity of PCSK9 is not required for degradation of ApoER2, VLDLR and LDLR. (A) HEK293 cells were co-transfected with ApoER2, VLDLR and LDLR either with an empty vector (Ctl), full-length PCSK9-wt or PCSK9-D374Y. For trans expression of PCSK9 (t-PCSK9-wt, t-PCSK9-D374Y, t-PCSK9-H226A/D374Y), V5-proPC9 was respectively co-expressed with different PCSK9 constructs lacking its proregion (Δ proPC9-wt, Δ proPC9-D374Y, Δ proPC9-H226A/D374Y). Twenty-four hours later, the steady state levels of the receptors were analyzed by Western blot. The levels of PCSK9 in cell lysates and media are shown for LDLR expressing cells. Similar results were obtained with ApoER2 and VLDLR expressing cells (not shown). (B) HuH7 were transiently transfected with either PCSK9-wt or PCSK9-D374Y or co-transfected with V5-proPC9 and Δ proPC9-wt. Confocal microscopy revealed that PCSK9-wt and PCSK9-D374Y (Ab:PC9; red) co-localized with the late-endosomes/lysosomes marker (Ab:CI-MPR; blue). We also show that trans-expression of V5-proPCSK9 (Ab:V5; blue) and Δ proPC9-wt (Ab:PC9; red) co-localized in subcellular compartment likely late-endosomes/lysosomes. Similar data were obtained in a separate duplicate experiment (not shown). Scale bar: 10 μ m.

FIG.3. LDLR-independent degradation of ApoER2 and VLDLR by PCSK9. (A) CHO-A7 cells were transiently co-transfected with ApoER2 or VLDLR either with an empty vector (pIRES; Ctl) or different PCSK9 constructs (-wt or -D374Y). (B) Western blot using the PCSK9 antibody Ab:P9 (10) of conditioned media derived from HEK293 cells expressing either empty vector, PCSK9 (in duplicate) or its D374Y mutant (in duplicate). (C) Western blot of either DNA3-A7 or ApoER2-A7 cells incubated overnight with media obtained in (B) using either Ab:ApoER2 or Ab:P9. (D) Western blot of either DNA3-A7 or VLDLR-A7 cells incubated overnight with media obtained in (B) using either Ab:VLDLR or Ab:P9.

The levels of cellular β -actin are shown as a measure of gel loading. Cellular association of exogenous PCSK9-wt and PCSK9-D374Y on ApoER2-A7 and VLDLR-A7 are shown in duplicates (C-D).

FIG.4. Additive binding of exogenous PCSK9 on CHO-A7 cells co-expressing LDLR with either ApoER2 or VLDLR. (A) HEK293 cells were transiently transfected with either an empty vector (Ctl), PCSK9-wt or PCSK9-D374Y. The levels of secreted PCSK9 are shown by Western blot analysis using the antibody Ab:P9 (10). (B-D) DNA3-A7 (B), ApoER2-A7 (C) and VLDLR-A7 (D) cells were transfected with either an empty vector or with LDLR (+LDLR). Twenty-four hours post-transfection, cells were incubated overnight with different conditioned media obtained in (A). The steady state levels of LDLR and respective receptors (ApoER2 or VLDLR) were analyzed by Western blot. Cellular association of exogenous PCSK9 was also analyzed by Western blot for all cell lines (B-D). The levels of cellular β -actin are shown as a measure of gel loading. Similar data were obtained in a separate duplicate experiment (not shown).

FIG.5. The cytosolic adaptor protein Dab1 markedly increase the activity of exogenous PCSK9 on ApoER2 and VLDLR degradation. (A) Immunodetection of PCSK9 in HEK293 cells and media transfected with an empty vector (pIRES; Ctl), PCSK9-wt and PCSK9-D374Y. (B) Western blot analyses of NIH 3T3 cells that stably expressed the Dab1 protein and either ApoER2 (A+/D) or VLDLR (V-/D) were incubated for 6h or 24h with conditioned media derived from HEK293 cells (see A). The LDLR represents endogenous levels of VLDLR-expressing cells. Quantifications were performed using ImageQuant software and normalized as 1 for the different time course. The level of PCSK9 remaining after the incubation period is shown here only for in the spent media and cell, lysates of stable VLDLR-cells. Similar results were obtained with the ApoER2 stable transfectants (not shown). Similar data were obtained in three independent experiments (not shown).

FIG.6. Internalized PCSK9 co-localizes with ApoER2 and VLDLR. As in Fig.2, NIH 3T3 cells (A+/D panel A and V-/D, panel B) were incubated with PCSK9-V5 conditioned

media for 24h. Incubation with a control media derived from HEK293 cells expressing an empty vector (pIRES-V5) served as a negative control. Confocal microscopy revealed that PCSK9 (Ab:V5; red) and either ApoER2 or VLDLR (blue) co-localized in intracellular and perinuclear structures likely endosomes (right/lower panels). Similar data were obtained in a separate duplicate experiment (not shown). Scale bar: 10 μ m.

FIG.7. Intracellular targeting of PCSK9 increases its degradation propriety on LDLR. (A) Schematic representation of intracellular and cell surface targeting strategies using membrane-bound PCSK9-chimeras representing full-length PCSK9-V5 fused with different transmembrane (TM) and cytosolic tail segments (ACE2, angiotensin-converting enzyme-2; LAMP-1, lysosomal-associated membrane protein-1; LDLR, low density lipoprotein receptor). (B) Biosynthetic analysis of HEK293 cells co-expressing PCSK9 or its transmembrane-chimeras and either LDLR (+) or an empty vector (-) and radiolabeled with 35 S-(Cys+Met) for 4h. The cell lysates and media were immunoprecipitated with a mAb:C7 or mAb:V5 for LDLR and PCSK9 detection, respectively. The immunoprecipitates were resolved by 8% SDS-PAGE and autoradiographed. Similar results were obtained two other independent experiments.

FIG.8. Specificity of PCSK9-L1 on LDLR degradation and its late endosomes/lysosomes localization. (A) Western blot analysis of HuH7 cell lysates 24h post transient transfection with either empty pIRES vector (Ctl), recombinant PCSK9, PCSK9-L1, or integrin β 3-L1 in the presence or absence of 10 mM NH₄Cl. The antibodies used for immunoblotting (IB) are: LDLR, HGFR, Lamp1, PCSK9 or β -actin. (B) Immunocytochemistry at the confocal level of the above PCSK9 or PCSK9-L1 cells incubated with 10 mM NH₄Cl overnight using PCSK9 (blue) or CI-MPR (red) antibodies. Arrows point towards co-localizations in late-endosomes/lysosomes positive for CI-MPR. Similar data were obtained in three other independent experiments (not shown). Scale bar: 10 μ m.

FIG.9. Cell-line independent degradation of ApoER2, VLDLR and LDLR by PCK9-L1. Western blot analysis of ApoER2, VLDLR, LDLR and PCSK9 in lysates of three different

cell lines (Neuro2A, neuronal; HuH7, hepatic; CHO-K1, ovary), co-expressing each of the receptors ApoER2, VLDLR or LDLR with either pIRES (Ctl), PCSK9 or PCSK9-L1. The loading of each lane was referenced to that of the control β -actin. Similar data were obtained in three other independent experiments (not shown).

FIG.10. Comparative ISH of mouse PCSK9 and either ApoER2 or VLDLR. Left panel shows whole mouse ISH data (ApoER2, PCSK9 and VLDLR) and the hematoxylin Eosin staining (H & E) at post natal day (P1). Right panel shows the details of the ISH in cerebellum after emulsion (A-C). The stars point to the major silver staining spots pointing to the highest expression level in the folia (A'-C'). Cx, brain cortex; Cb, cerebellum; Spc, spinal cord; Th, thymus; M, muscle; H, heart; Li, liver; St, stomach; Spl, spleen; K, kidney, SI, small intestine. Scale bar: 1 cm.

FIG.S1. Sequence alignment of the LDLR family members. Primary sequence of human LDLR (NP_000518), VLDLR (NP_003374) and ApoER2 (NP_150643) were aligned using the Multalin and Genedoc software

FIG.S2. Comparative subcellular localization of PCSK9 and its membrane-bound chimeras. The immunocytochemical localization of PCSK9-chimeras in HuH7 cells transiently expressing PCSK9-LDLR, PCSK9-ACE2 and PCSK9-L1 using with (Ab: V5; red) is compared to that of the late-endosomes/lysosomes marker (Ab: CI-MPR; blue). Note the high cell-surface localization of PCSK9-LDLR and PCSK9-ACE-2 (light arrows). Heavy arrows emphasize the co-localization of PCSK9-chimeras with the late-endosomes/lysosomes marker (CI-MPR). Scale bar: 10 μ m.

FIG.S3. Binding of PCSK9 to endogenous LDLR and degradation of ApoER2, VLDLR and LDLR in COS-1 cells. (A) Western blot analysis of COS-1 cells co-transfected with either an empty vector (Ctl), PCSK9-wt, its D374Y mutant or PCSK9-L1 with each of the receptors ApoER2, VLDLR or LDLR. The cellular levels of the precursor proPCSK9 and its product PCSK9 were estimated with Ab:P9. (B) COS-1 cells were incubated for 24h

with conditioned media derived from transiently transfected HEK293 cells expressing an empty vector (Ctl), PCSK9-wt or its D374Y mutant. The cells lysates and media were then analyzed by Western blot using either LDLR or PCSK9 antibodies. Similar data were obtained in three other independent experiments (not shown).

2.6. REFERENCES

1. Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (2006) *Science* 311, 1721-1723
2. Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., and Chretien, M. (2003) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 928-933
3. Benjannet, S., Rhains, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M. C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D., Trillard, M., Abifadel, M., Tebon, A., Attie, A. D., Rader, D. J., Boileau, C., Brissette, L., Chretien, M., Prat, A., and Seidah, N. G. (2004) *J.Biol.Chem.* 279, 48865-48875
4. Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derre, A., Villegier, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J. M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N. G., and Boileau, C. (2003) *Nat.Genet.* 34, 154-156
5. Seidah, N. G., Khatib, A. M., and Prat, A. (2006) *Biol.Chem.* 387, 871-877
6. Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2007) *Trends Biochem.Sci.* 32, 71-77
7. Maxwell, K. N. and Breslow, J. L. (2004) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 7100-7105
8. Rashid, S., Curtis, D. E., Garuti, R., Anderson, N. N., Bashmakov, Y., Ho, Y. K., Hammer, R. E., Moon, Y. A., and Horton, J. D. (2005) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 5374-5379
9. Maxwell, K. N., Fisher, E. A., and Breslow, J. L. (2005) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 2069-2074

10. Nassoury, N., Blasiolo, D. A., Tebon, O. A., Benjannet, S., Hamelin, J., Poupon, V., McPherson, P. S., Attie, A. D., Prat, A., and Seidah, N. G. (2007) *Traffic*. 8, 718-732
11. Lagace, T. A., Curtis, D. E., Garuti, R., McNutt, M. C., Park, S. W., Prather, H. B., Anderson, N. N., Ho, Y. K., Hammer, R. E., and Horton, J. D. (2006) *J Clin. Invest* 116, 2995-3005
12. Park, S. W., Moon, Y. A., and Horton, J. D. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 50630-50638
13. Timms, K. M., Wagner, S., Samuels, M. E., Forbey, K., Goldfine, H., Jammulapati, S., Skolnick, M. H., Hopkins, P. N., Hunt, S. C., and Shattuck, D. M. (2004) *Hum. Genet.* 114, 349-353
14. Leren, T. P. (2004) *Clin. Genet.* 65, 419-422
15. Bourbon, M., Alves, A. C., Medeiros, A. M., Silva, S., and Soutar, A. K. (2007) *Atherosclerosis*
16. Naoumova, R. P., Tosi, I., Patel, D., Neuwirth, C., Horswell, S. D., Marais, A. D., van Heyningen, C., and Soutar, A. K. (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2654-2660
17. Cunningham, D., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Griffor, M. C., Hawkins, J. L., Subashi, T. A., Varghese, A. H., Ammirati, M. J., Culp, J. S., Hoth, L. R., Mansour, M. N., McGrath, K. M., Seddon, A. P., Shenolikar, S., Stutzman-Engwall, K. J., Warren, L. C., Xia, D., and Qiu, X. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 413-419
18. Cameron, J., Holla, O. L., Ranheim, T., Kulseth, M. A., Berge, K. E., and Leren, T. P. (2006) *Hum. Mol. Genet.* 15, 1551-1558
19. Benjannet, S., Rhains, D., Hamelin, J., Nassoury, N., and Seidah, N. G. (2006) *J Biol. Chem.* 281, 30561-30572

20. Zhang, D. W., Lagace, T. A., Garuti, R., Zhao, Z., McDonald, M., Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2007) *J.Biol.Chem.* 282, 18602-18612
21. McNutt, M. C., Lagace, T. A., and Horton, J. D. (2007) *J.Biol.Chem.* 282, 20799-20803
22. Howell, B. W. and Herz, J. (2001) *Curr.Opin.Neurobiol.* 11, 74-81
23. Corpet, F. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 10881-10890
24. Mayer, H., Duit, S., Hauser, C., Schneider, W. J., and Nimpf, J. (2006) *Mol.Cell Biol.* 26, 19-27
25. Krieger, M. (1983) *Cell* 33, 413-422
26. Benjannet, S., Savaria, D., Laslop, A., Munzer, J. S., Chretien, M., Marcinkiewicz, M., and Seidah, N. G. (1997) *J.Biol.Chem.* 272, 26210-26218
27. Benjannet, S., Elagoz, A., Wickham, L., Mamarbachi, M., Munzer, J. S., Basak, A., Lazure, C., Cromlish, J. A., Sisodia, S., Checler, F., Chretien, M., and Seidah, N. G. (2001) *J.Biol.Chem.* 276, 10879-10887
28. Koch, S., Strasser, V., Hauser, C., Fasching, D., Brandes, C., Bajari, T. M., Schneider, W. J., and Nimpf, J. (2002) *EMBO J.* 21, 5996-6004
29. Strasser, V., Fasching, D., Hauser, C., Mayer, H., Bock, H. H., Hiesberger, T., Herz, J., Weeber, E. J., Sweatt, J. D., Pramatarova, A., Howell, B., Schneider, W. J., and Nimpf, J. (2004) *Mol.Cell Biol.* 24, 1378-1386
30. Conesa, M., Prat, A., Mort, J. S., Marvaldi, J., Lissitzky, J. C., and Seidah, N. G. (2003) *Biochem.J.* 370, 703-711

31. Marcinkiewicz, M., Marcinkiewicz, J., Chen, A., Leclaire, F., Chretien, M., and Richardson, P. (1999) *J.Comp Neurol.* 403, 471-485
32. Reiner, O., Cahana, A., Escamez, T., and Martinez, S. (2002) *Mol.Psychiatry* 7, 12-16
33. Seidah, N. G. and Prat, A. (2007) *J.Mol.Med.* 85, 685-696
34. Nour, N., Mayer, G., Mort, J. S., Salvas, A., Mbikay, M., Morrison, C. J., Overall, C. M., and Seidah, N. G. (2005) *Mol.Biol.Cell* 16, 5215-5226
35. Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R. E., and Acton, S. (2000) *Circ.Res.* 87, E1-E9
36. Rohrer, J., Schweizer, A., Russell, D., and Kornfeld, S. (1996) *J.Cell Biol.* 132, 565-576
37. Fisher, T. S., Lo, S. P., Pandit, S., Mattu, M., Santoro, J. C., Wisniewski, D., Cummings, R. T., Calzetta, A., Cubbon, R. M., Fischer, P. A., Tarachandani, A., De Francesco, R., Wright, S. D., Sparrow, C. P., Carfi, A., and Sitlani, A. (2007) *J.Biol.Chem.* 282, 20502-20512
38. Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R. E., Richardson, J. A., and Herz, J. (1999) *Cell* 97, 689-701
39. Zhao, S., Hu, X., Park, J., Zhu, Y., Zhu, Q., Li, H., Luo, C., Han, R., Cooper, N., and Qiu, M. (2007) *Dev.Dyn.* 236, 2708-2712
40. Stolt, P. C. and Bock, H. H. (2006) *Cell Signal.* 18, 1560-1571

41. Poirier, S., Prat, A., Marcinkiewicz, E., Paquin, J., Chitramuthu, B. P., Baranowski, D., Cadieux, B., Bennett, H. P., and Seidah, N. G. (2006) *J Neurochem.* 98, 838-850
42. Zhao, Z., Tuakli-Wosornu, Y., Lagace, T. A., Kinch, L., Grishin, N. V., Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2006) *Am.J Hum.Genet.* 79, 514-523
43. Hooper, A. J., Marais, A. D., Tanyanyiwa, D. M., and Burnett, J. R. (2007) *Atherosclerosis* 193, 445-448

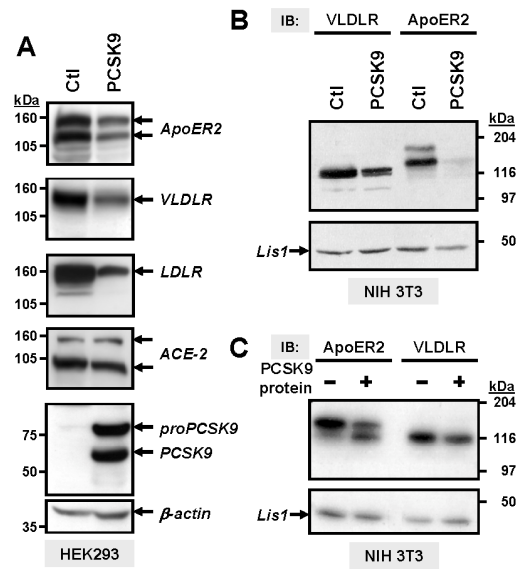


Figure 1

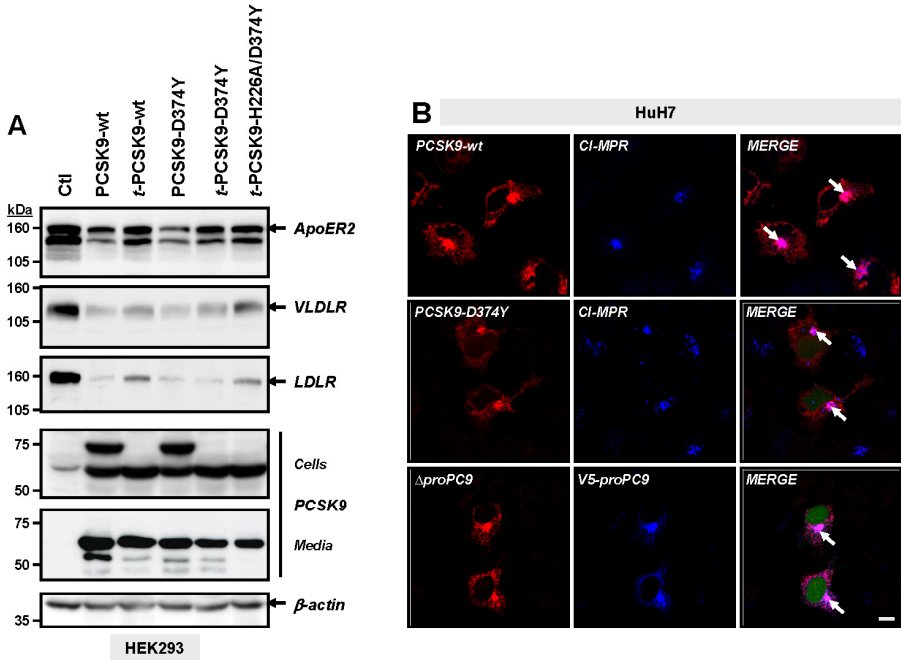


Figure 2

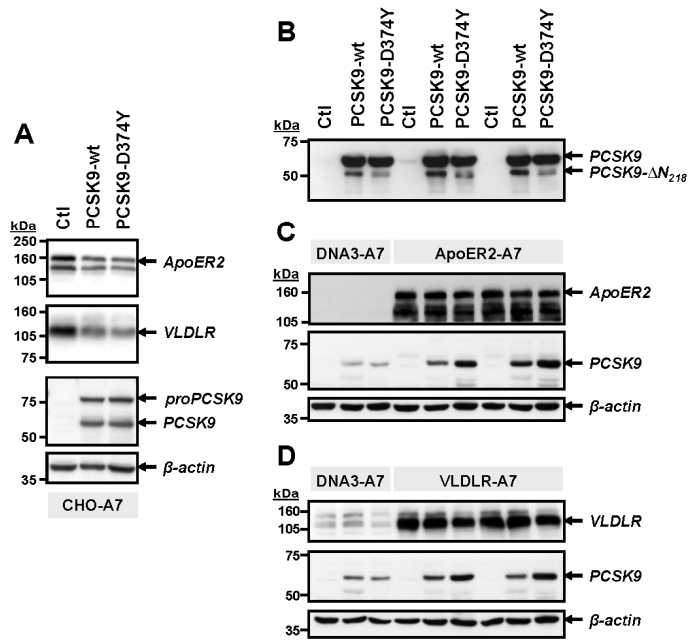


Figure 3

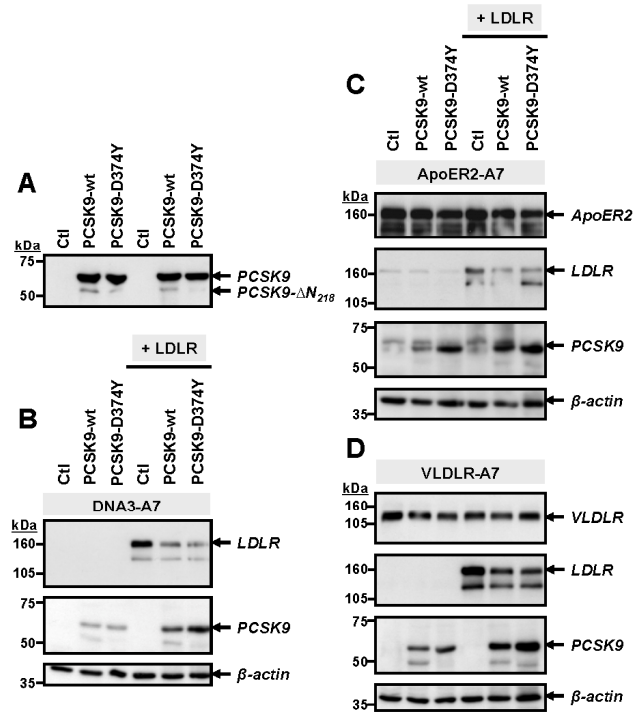


Figure 4

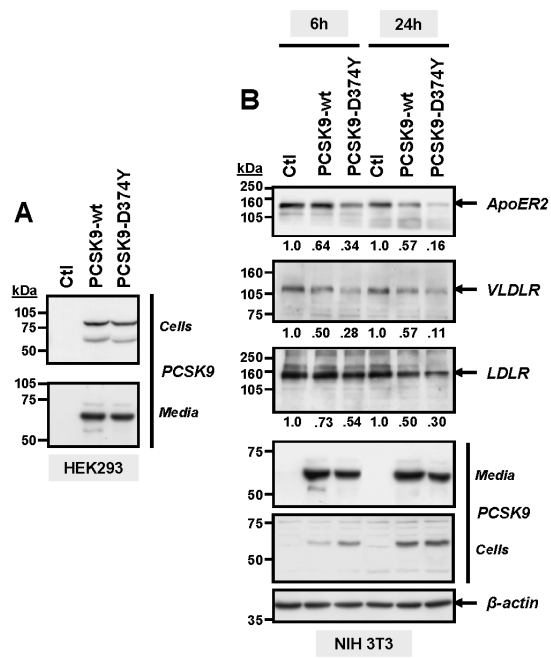


Figure 5

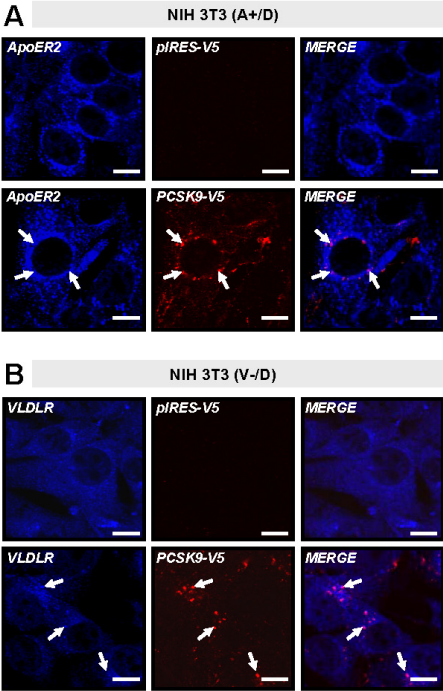


Figure 6

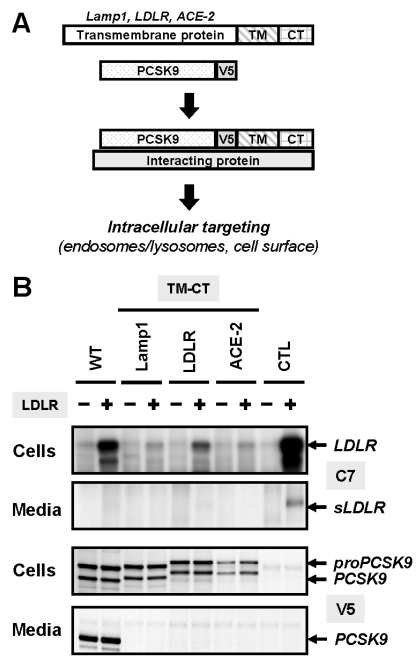


Figure 7

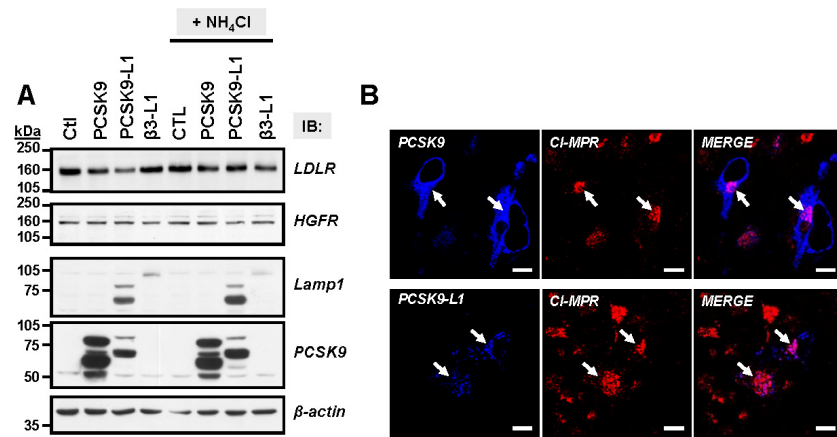


Figure 8

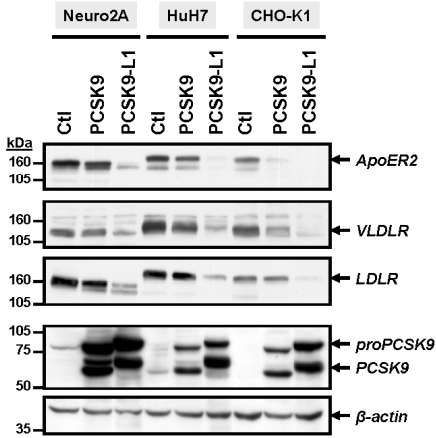


Figure 9

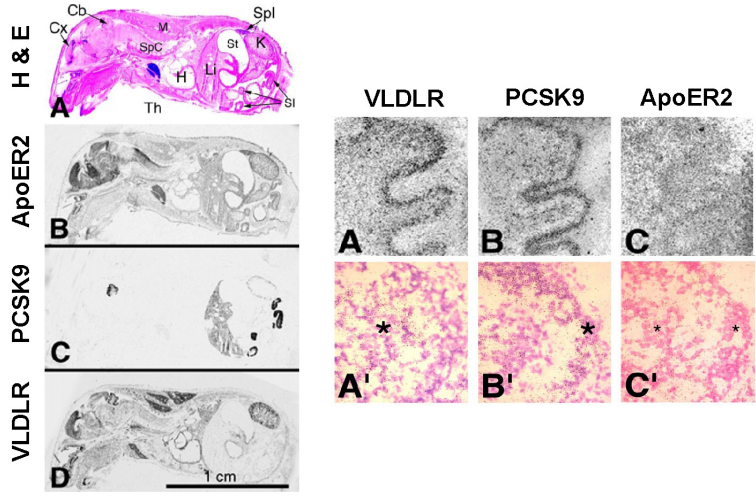


Figure 10

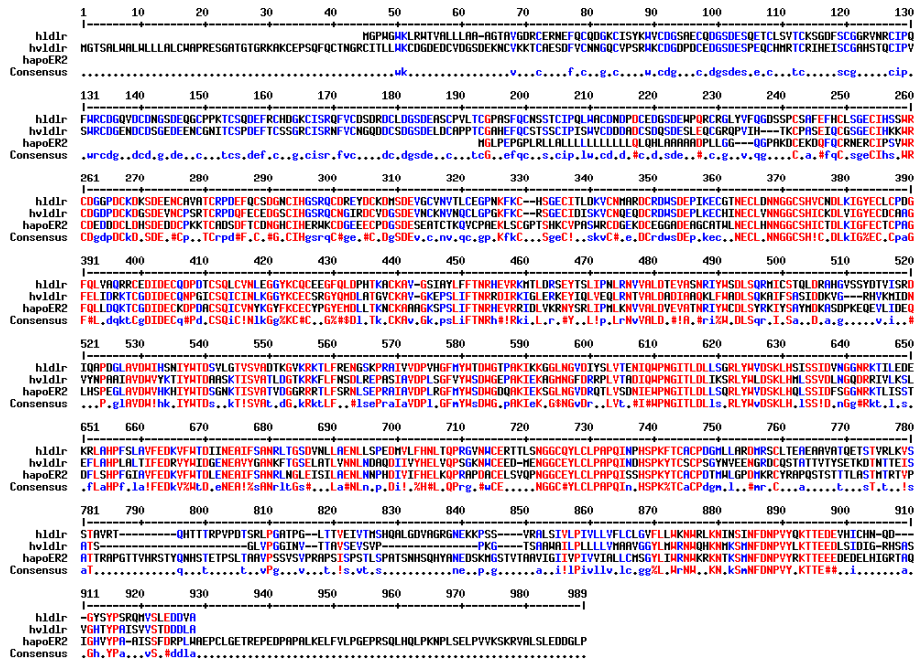


Figure S1

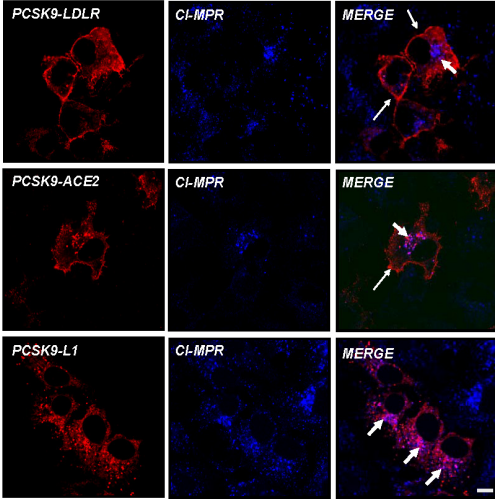


Figure S2

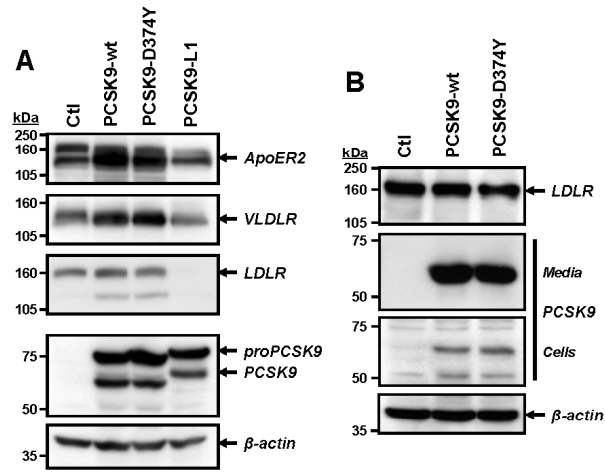


Figure S3

Chapitre III: Article 2

Titre : *Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: EVIDENCE FOR AN INTRACELLULAR ROUTE.*

Auteurs : Steve Poirier, Gaétan Mayer, Viviane Poupon, Peter S. McPherson, Roxane Desjardins, Kevin Ly, Marie-Claude Asselin, Robert Day, Franck J. Duclos, Mark Witmer, Rex Parker, Annik Prat et Nabil G. Seidah

Journal : *Journal of Biological Chemistry, Vol. 284, No. 42, pp. 28856-28864.*

Contribution : conceptualisation (70%); optimisation et expérimentation (80%); rédaction (50%)

Pertinence

Il fut démontré que PCSK9 induit la dégradation du LDLR soit de manière intra- et extracellulaire.^{140, 239} Cette distinction fut possible grâce aux souris déficientes pour la protéine cytosolique ARH, importante pour l'endocytose du LDLR.^{117, 119} En effet, l'action extracellulaire de PCSK9 sur la dégradation intracellulaire du LDLR serait dépendante de l'ARH et il fut observé que le récepteur est sensible à la surabondance hépatique de PCSK9, en absence d'ARH. Ces observations suggèrent qu'il existerait deux voies dans la dégradation du LDLR par PCSK9 soit : intra- (ARH-indépendante) et extracellulaire (ARH-dépendante). Par contre, il est important de noter que ces travaux ont été effectués en conditions de forte surabondance de PCSK9, ce qui n'est peut-être pas représentatif des concentrations retrouvées physiologiquement.

Cet article propose pour la première fois une dissection des voies intra- et extracellulaire et ce, de manière endogène. Par une série d'expériences, nous avons démontré que l'intégrité du trafic intracellulaire est une composante majoritaire dans l'action de PCSK9 sur le LDLR. Jusqu'à présent, la surabondance de PCSK9 avait proposé que la dégradation du LDLR emprunte plutôt la voie extracellulaire. Nos travaux, à contre-courant, posent un regard critique sur la littérature et apportent des éléments de réponse quant aux voies cellulaires impliquées de manière endogène. Dans le but de contrer l'hypercholestérolémie et les MCV, il est évident que l'étude du trafic cellulaire de PCSK9 est primordiale pour bien cerner et cibler d'éventuelles molécules inhibitrices.



Title: Dissection of the Endogenous Cellular Pathways of PCSK9-induced Low Density Lipoprotein Receptor

Degradation: EVIDENCE FOR AN INTRACELLULAR ROUTE

Author: Steve Poirier, Gaetan Mayer, Viviane Poupon, Peter S. McPherson, Roxane Desjardins, Kevin Ly, Marie-Claude Asselin, Robert Day, Franck J. Duclos, Mark Witmer, Rex Parker, Annik Prat, Nabil G. Seidah

Publication: Journal of Biological Chemistry

Publisher: The American Society for Biochemistry and Molecular Biology

Date: Oct 16, 2009

Copyright © 2009, by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology

Logged in as:
Steve Poirier

LOGOUT

Non-profit/Non-commercial Use

For **Non-profit/Non-commercial** uses: You are free to copy, distribute, transmit and to adapt the work under the following conditions:

Attribution. You must attribute the work in the manner specified by the author or licensor (but not in any way that suggests that they endorse you or your use of the work).

Non-commercial. You may not use the work for commercial purposes; including original authors reusing content by a commercial publisher.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2010 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#) Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

DISSECTION OF THE ENDOGENOUS CELLULAR PATHWAYS OF PCSK9-INDUCED LDLR DEGRADATION: EVIDENCE FOR AN INTRACELLULAR ROUTE

Steve Poirier*, Gaetan Mayer*, Viviane Poupon†, Peter S. McPherson†, Roxane Desjardins‡, Kevin Ly‡, Marie-Claude Asselin*, Robert Day‡, Franck J. Duclos§, Mark Witmer§, Rex Parker§, Annik Prat* and Nabil G. Seidah*¶

*Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal

110 Pine Ave. West, Montreal, QC H2W 1R7, Canada

†Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute

McGill University, Montreal, QC H3A 2B4, Canada

‡Department of Pharmacology, University of Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada

§Bristol-Myers Squibb, Princeton, New Jersey 08543-4000, USA

Running title: Intracellular pathway of LDLR degradation

¶Address correspondence to: Nabil G. Seidah: Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Avenue West Montreal, QC H2W 1R7, Canada. Tel: (514) 987-5609; Fax: (514) 987-5542

Elevated levels of plasma LDL-cholesterol, leading to familial hypercholesterolemia, are enhanced by mutations in at least 3 major genes, the LDL receptor (LDLR), its ligand apolipoprotein B, and the proprotein convertase PCSK9. Single point mutations in PCSK9 are associated with either hyper- or

hypocholesterolemia. Accordingly, PCSK9 is an attractive target for treatment of dyslipidemia. PCSK9 binds the EGF-A domain of the LDLR and directs it to endosomes/lysosomes for destruction. While the mechanism by which PCSK9 regulates LDLR degradation is not fully resolved, it seems to involve both intracellular and extracellular pathways. Herein, we show that clathrin-light chain siRNAs that block intracellular trafficking from the trans Golgi network to lysosomes, rapidly increased LDLR levels within HepG2 cells in a PCSK9-dependent fashion, without affecting the ability of exogenous PCSK9 to enhance LDLR degradation. In contrast, blocking the extracellular LDLR endocytosis/degradation pathway by 4-6h incubation of cells with Dynasore or an EGF-AB peptide, or by knockdown of endogenous ARH, did not significantly affect LDLR levels. The present data from HepG2 cells and mouse primary hepatocytes favor a model whereby depending on the dose and/or incubation period, endogenous PCSK9 enhances the degradation of the LDLR both extra- and intracellularly. Therefore targeting either pathway, or both, would be an effective method to reduce PCSK9 activity in the treatment of hypercholesterolemia and coronary heart disease.

3.1. INTRODUCTION

High levels of circulating low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) represent a major risk factor that leads to coronary heart disease, the main cause of death and morbidity worldwide (1). LDL particles are mainly cleared from the bloodstream by the hepatic cell surface LDL receptor (LDLR) (2). Genetics studies demonstrated that loss-of-function mutations in either LDLR or apolipoprotein B, the protein component of LDL that binds LDLR, result in familial hypercholesterolemia and premature coronary heart disease (3). More recently, the PCSK9 gene (4), which is highly expressed in liver and small intestine (5), was identified as the third locus associated with familial hypercholesterolemia (6). It is now clear that PCSK9 binds the LDLR and triggers its intracellular degradation in acidic compartments, resulting in increased circulating plasma cholesterol (7-10).

Following its autocatalytic cleavage, PCSK9 is secreted as a stable non-covalent complex with its prosegment [pro-PCSK9] (5,7). This cleavage results in a conformational change (11), which favors the binding of PCSK9 to the EGF-A domain of the LDLR (12), with increased affinity at acidic pHs (11). While the C-terminal Cys-His rich domain (CHRD) of PCSK9 is a spatially separate domain (11) that does not participate directly in the PCSK9-EGF-A interaction (12), it is a critical determinant for the PCSK9-enhanced cellular degradation of the LDLR (13). In agreement, we recently demonstrated that annexin A2, which binds the CHRD of PCSK9, blocks its effect on LDLR degradation (14).

Overexpression studies in liver suggested that both intra- and extracellular PCSK9 target the LDLR (9,15,16) towards degradation in late endosomes/lysosomes (LE/L) (7-10). It was shown that the adaptor protein ARH, which interacts with the cytosolic tail of the LDLR, is essential for the endocytosis and degradation of the cell surface PCSK9-LDLR complex in vivo (16). On the other hand, hepatic LDLR protein levels were also reduced upon overexpression of PCSK9 in Arh^{-/-} mice (9), suggesting the presence of an ARH-independent intracellular pathway. Intriguingly, at endogenous levels of PCSK9, the absence of ARH did not affect hepatic LDLR subcellular localization in LE/L or protein levels (17). This is not the expected result if PCSK9 mostly targets LDLR by the extracellular pathway (18), as one would have expected that in Arh^{-/-} mice total LDLR levels should have been more elevated.

In this study, we focused on the relative contribution of the intra- versus extracellular pathways of endogenous PCSK9-induced LDLR degradation. This information should guide the choice of therapeutic approaches that will best target the site of PCSK9-LDLR interaction in order to control hypercholesterolemia and coronary heart disease.

3.2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids and reagents - Human PCSK9 and its mutant cDNAs were cloned into pIRES2-EGFP (Clontech, Mountain view CA) as described (5). HepG2 and HEK293 cells (American Type Culture Collection) were routinely cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent). Low density lipoprotein coupled with 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocya-nine perchlorate (diI-LDL) and lipoprotein deficient serum (LPDS) were from Biomedical technologies. 3-hydroxy-naphthalene-2-carboxylic acid (3,4-dihydroxy-benzylidene)-hydrazide monohydrate (Dynasore) was purchased from Sigma. Purified recombinant human hPCSK9 was provided by Bristol-Myers Squibb.

siRNA- and shRNA-mediated knockdowns - Using the siPORT NeoFx reagent (Ambion), 3×10^5 HepG2 cells were plated in a 35 mm dish and simultaneously transfected either with 50 nM of an Alexa Fluor 555 non-silencing siRNA (siCtl, Qiagen), both specific siRNAs (siCLCa, 5' GGAAAGUAAUGGUCCAACA; siCLCb, 5' GGAACCAGCGCCAGAGUGA, Dharmacon) or 7.5 nM of Silencer Select (siARH, 5' GGCUGUUACCCUCACCGUA, Ambion) and maintained in complete media for 72h. Unless stated otherwise, at 48h post-transfection cells were washed twice with DMEM incubated overnight in 1 ml of DMEM (Gibco). HEK293 cells were transfected with 60 nM of specified siRNAs using Lipofectamine (Invitrogen), as described by the manufacturer. After 6h, complete media were replaced and cells collected 72h post-transfection.

Mission® shRNAs constructs in pLKO.1-puro vector (Sigma-Aldrich) targeting hPCSK9 (shPCSK9-1, 5'-CCGGGAATGCAAAGTCAAG

GAGCATCTCGAGATGCTCCTTGACTTTGCATTCTTTTTG; and shPCSK9-2, 5'-CCGGGCCAGCAAGTGTGACAGTCATCTCGAGATGACTGTCACACTTGCTGGCTTTTG) and controls (non-target shNT, and empty vector pLKO) were used to generate

lentiviral particles in the packaging cell line HEK293 FT. This was done by co-transfecting the recombinant lentiviral vectors with packaging plasmids (Invitrogen) using Lipofectamine 2000. Viral supernatants were filtered through a 0.45 μm filter after 3 days post-transfections. A total of 1.5×10^5 of HepG2 cells were plated in a 35 mm dish one day prior to infection. Transductions with lentivirus were made at various multiplicity of infection in the presence of polybrene (4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Infections were made in duplicate to increase accuracy. Stable selection with puromycin (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) was done to obtain a pool of transduced cells for each shRNA sequence and control. Total RNA was isolated and analyzed with Real-Time PCR using SyBrGreen.

Western Blot analysis - Cells were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in complete RIPA buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1% (v/v) Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl and 0.1% (v/v) SDS) supplemented with 1x Complete Protease Inhibitor Mixture (Roche Applied Science). Proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and blotted on HyBond nitrocellulose membranes (GE Healthcare), which were blocked for 1 h in TBS-T (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) containing 5% nonfat dry milk. Membranes were then incubated 3h in 1% nonfat milk with the respective antibodies: m,hLDLR (1:1000, R&D Systems), hTfR (1:1000, BD Biosciences), hPCSK9 (1:2500) (10), hCLCa and b (1:10000) (19), hARH (1:1000, Abcam), β -actin (1:5000, Sigma). Appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:10,000, Sigma) were used for detection with enhanced chemiluminescence using the ECL plus kit (GE Healthcare).

Fluorescence-Activated cell sorting - Using Fugene HD reagent (Roche), 3h after passage 1×10^6 HepG2 cells were transiently transfected with a bicistronic vector (pIRES-PCSK9, Clontech), which encodes both different human PCSK9 constructs (H226A, WT, D374Y) and the enhanced green fluorescent protein (EGFP). 24h post-transfection, cells were washed three times with calcium/magnesium free PBS containing 0.5% Bovine Serum

albumin (solution A, Sigma). Cells were then incubated 5 min at 37°C with 500 µl of 1x Versene solution (Invitrogen) and diluted in 15 ml of solution A. Cells were then centrifuged for 3 min at 1000 rpm and resuspended in 1 ml of solution A together with 1:200 of LDLR antibody (R&D Systems) for 45 min. Cells were washed once with 5 ml of solution A, centrifuged and resuspended for 15 min in 1 ml of PBS containing 1:300 of Alexa Fluor 647 donkey anti-goat (Molecular Probes). Cells were washed and resuspended in 300 µl of PBS 0.3% of propidium iodide (PI). Viable cells (PI-negative) were then analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) for both EGFP and Alexa Fluor 647 using the FACS BD LSR (BD Biosciences). HEK293 cells were transfected with pIRES-PCSK9 using Lipofectamine reagent (Invitrogen). 24h post-transfection, the cells were then co-cultured in an increasing amount together with untransfected HEK293 cells. After overnight incubation, cells were analyzed by FACS as described above.

Immunocytochemistry - Cells were washed three times with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100/PBS for 10 min, and incubated with 150 mM glycine to stabilize the aldehydes. The cells were then incubated for 30 min with 1% BSA (Fraction V, Sigma) containing 0.1% Triton X-100, followed by overnight incubation at 4°C with selected antibodies (1:100 goat polyclonal anti-LDLR; R&D Systems, 1:1000 rabbit polyclonal CLCs (19); 1:500 mouse monoclonal cation-independent mannose 6-phosphate receptor; CI-MPR, Abcam) The cells were then incubated for 60 min with corresponding AlexaFluor-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes) and mounted in 90% glycerol containing 1% 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO, Sigma). Immunofluorescence analyses were performed with a Zeiss LSM-510 confocal microscope coupled with a Nikon Eclipse TE2000-U laser-scanning microscope with 408-, 488-, and 543-nm laser lines. Images were processed with Adobe Photoshop CS2, version 9.0 (Adobe Systems).

Preparation and incubation of HepG2 cells with EGF-AB - GST-EGF-AB was captured and washed on a glutathione Sepharose 4B resin and cleaved on the column using

human alpha-thrombin. Cleaved EGF-AB was then applied to a size exclusion column, pre-equilibrated and eluted in refolding buffer. After incubation in open tubes at 20°C for 2 days, properly refolded EGF-AB was isolated as a TFA salt using preparative reversed-phase chromatography, followed by lyophilization. Refolded EGF-AB conformer, containing 6 disulfide bridges, was recovered from preparative reversed-phase chromatography at 94.5% purity, as determined by analytical reversed-phase chromatography and mass spectrometry. Lyophilized EGF-AB peptide was resuspended in PBS at 1 mM and frozen at -80°C until added into DMEM media with or without purified human PCSK9 and incubated with HepG2 cells, as described.

LDL-receptor activity assay - HepG2 cells were plated in a 96-well poly D lysine coated plate (Becton Dickinson) at a density of 15,000 cells/well in RPMI 1640 (Invitrogen), containing 5% lipoprotein-deficient serum (Intracel). After 18h, purified PCSK9 protein with or without EGF-AB was added to the cells in 30 µl of medium (RPMI 1640 containing 5% LPDS). After 2h or 24h of incubation at 37°C, 5 µg/ml diI-LDL (Biomedical Technologies) were added to the cell media, and cells returned to tissue culture incubator for another 2h. Cells were then fixed in presence of a 2% paraformaldehyde solution containing 4 µg/ml Hoechst (Molecular Probes). After 3 washes of the cell layer, plates were scanned on Cellomics Array-scan (Thermo). DiI-LDL uptake measured as the mean total intensity of fluorescence per cell was obtained from quadruplicate wells and an average read of 500-700 cells/well for each treatment condition. Data was analyzed using Graph Pad Prism 4.

PCSK9 ELISA - LumiNunc Maxisorp white assay plates (Nunc, Denmark) were coated with 0.5 µg per well of PCSK9-Ab by incubation at 37°C for 3h in PBS (NaPO₄ 10 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.4) containing Na azide (1g/L), then stored at 4°C. The plates were washed six times before use with PBS containing Tween 20 (0.5ml/L) (PBST) and then incubated for 1h at room temperature with blocking buffer (PBS, casein 0.1%, merthiolate 0.01%). Calibrators were prepared using serial dilutions of recombinant PCSK9 in dilution

buffer (PBS, Urea 1.8 M, BSA 0.25% Tween-20 0.5 ml/L and merthiolate 0.01%). Samples were diluted 1:20 in dilution buffer without BSA. Calibrators and samples were incubated for 30 min in a water bath at 46°C prior to application (100 µl) in duplicate. The plates were incubated overnight at 37°C with shaking. After washing, 100 µl of hPCSK9-Ab-HRP diluted 1:750 were added for 3h at 37°C with shaking. Finally, after washing, 100µl of substrate (SuperSignal™ ELISA Femto Substrate, Pierce) was applied to each well. Chemiluminescence was quantified on a Pherastar luminometer (BMG Labtech). A standard curve was established using a conditioned medium containing recombinant human PCSK9. This standard medium was calibrated by comparison to a full length secreted and purified PCSK9. The peptide purity and concentration were determined by quantitative amino acid analysis following 18-24h hydrolysis in the presence of 5.7N HCl in vacuo at 110°C on a Beckman autoanalyzer (model 6300) with a post-column ninhydrin detection system coupled to a Varian DS604 data station (performed by Dr C. Lazure, IRCM). Plasma PCSK9 concentration was calculated by comparing sample luminescence to the standard luminescence curve.

Primary hepatocytes isolation - Hepatocytes were prepared from livers of wild-type C57BL/6 or pure genetic background *Pcsk9*^{-/-} (20) mice maintained on a normal chow diet in a 12h light/12h dark schedule and used between the ages of 8 and 12 weeks. All experiments performed were in accordance with protocols approved by the bioethics committee of IRCM. According to established protocols (21), livers were perfused using a peristaltic pump with 50ml of pH 7.4 HEPES buffer I (0.83% (w/v) NaCl, 0.05% (w/v) KCl, 0.24% (w/v) HEPES, 0.019% (w/v) EGTA) at a flow rate of 8 ml/min and then switched to 50 ml of pH 7.6 HEPES buffer II (0.39% (w/v) NaCl, 0.05% (w/v) KCl, 2.4% (w/v) HEPES, 0.07% (w/v) CaCl₂, 236U/ml Collagenase Type IV; Sigma) at a flow rate of 6 ml/min. Digested livers were filtered using a 70-100 µM cell strainers (Falcon). Isolated hepatocytes were then sequentially resuspended into 20 ml of William's medium E (Gibco) containing 10% FBS (Wisent) and 1x of antibiotic-antimycotic mixture (Gibco) and centrifuged at 1000 x rpm for 5 min. This procedure was repeated twice. Highly viable

hepatocytes preparations were plated on fibronectin (Sigma) pre-coated Primaria 6-well plates (Falcon) at an initial density of 1×10^6 cells/well in complete William's media. Fresh serum free hepatoZYME media was added to hepatocytes 4h after plating.

Immunoprecipitation of PCSK9 - Secreted mouse PCSK9 derived from isolated primary hepatocytes was detected, as described (20). Briefly, 1×10^6 hepatocytes were plated on 6-well plates in serum-free hepatoZYME media (Gibco) and incubated at 37°C for 48h. Using the rabbit IgG TrueBlot kit (eBioscience), 500 μl of conditioned media (1:4), 500 μl of complete RIPA buffer (0.5x), 50 μl of anti-rabbit IgG beads, and 3 μl of primary mouse PCSK9 antibody were incubated overnight on a rocking platform at 4°C . Samples were then centrifuged 3-times at 7000 x rpm and washed with 1 ml of complete 0.5x RIPA. Supernatants were completely removed and pellets were re-suspended in 60 μl of Laemli buffer, and 30 μl of immunoprecipitated PCSK9 were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis. Membranes were then incubated with mouse PCSK9 antibodies (1:2500) and probed with TrueBlot HRP anti-rabbit IgG (1:2000, eBioscience). A total of 50 μl of plasma (pooled from three 6-month old male mice) was used as above to analyze the level of circulating PCSK9.

3.3. RESULTS

Blockade of endocytosis in HepG2 cells does not affect endogenous LDLR levels - In order to directly examine the contribution of the extracellular pathway in PCSK9-induced LDLR degradation, we used two different approaches that aim to prevent endocytosis of the LDLR (Fig. 1). For this, we selected the human hepatic HepG2 cell line, which has been commonly used to study LDLR degradation by PCSK9, as it endogenously expresses both proteins. (i) Upon 6h incubation of naïve HepG2 cells with Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin GTPase activity (22), which virtually eliminated the internalization of diI-LDL (Fig. 1a), no significant change in total LDLR levels was observed by Western blot (Fig. 1b); (ii) Although siRNA-mediated knockdown of ARH

(KDARH) in HepG2 cells resulted in >80% reduction of its protein levels and as expected enriched cell surface LDLR levels (Fig. 1c), it did not affect total LDLR levels (Fig. 1d), in agreement with the reported unchanged levels of LDLR in the liver of *Arh*^{-/-} mice (17). We conclude that, in HepG2 cells, none of the above treatments that block LDLR endocytosis affected its total protein levels.

Inhibition of the PCSK9-induced LDLR degradation by EGF-AB - An EGF-AB peptide containing the LDLR binding site to PCSK9 was reported to inhibit the effect of exogenously added PCSK9 on LDLR degradation in either HEK293 or HepG2 cells (18,23,24). While the effect of WT EGF-AB on naïve HepG2 cells was not reported, the inhibitory effect of the gain of function EGF-AB H306Y is best seen with exogenous PCSK9, with little effect on naïve HepG2 cells (18). Therefore, we tested the antagonistic effects of various concentrations of EGF-AB on PCSK9's ability to induce LDLR degradation when added extracellularly (Fig. 2). The data show that in a dose-dependent manner (0.1-10 μ M) EGF-AB significantly reduced exogenous PCSK9 (67-200 nM) activity on LDLR with an EC_{50} of \sim 2 μ M after both 4h and 24h incubations. However, 4h incubation with EGF-AB did not affect the cellular incorporation of diI-LDL in absence of exogenous PCSK9 (Fig. 2a, open squares). In contrast, after 24h incubation of naïve HepG2 cells (secreting \sim 4 nM of PCSK9, as estimated from cells expressing a non-secretable PCSK9-H226A form; Fig. 4) with an increasing amount of EGF-AB we observed a < 20% increase in LDLR activity (Fig. 2b, open squares). In agreement, EGF-AB only slightly affected total LDLR protein levels in naïve HepG2 cells after incubation with as much as 12.5 μ M for 24h (Fig. 2c). We also noted that exogenously added EGF-AB peptide was not internalized by HepG2 cells (Fig. 2c). This excludes a possible interference with the PCSK9 intracellular LDLR degradation pathway. We conclude that inhibition of endogenously secreted PCSK9 by EGF-AB is only seen after 24h incubation, suggesting that the dosage and/or incubation time are important factors for extracellular PCSK9 activity on LDLR degradation.

Secreted PCSK9 from wild type hepatocytes does not affect LDLR in PCSK9 - deficient ones in 24h incubations. In agreement with whole liver data (20,25), LDLR levels increased by ~2.5-fold in primary hepatocytes from *Pcsk9*^{-/-} (KO) versus *Pcsk9*^{+/+} (WT) mice (Fig. 3). Thus, we tested the effect of secreted PCSK9 from primary hepatocytes of WT (+/+) mice (48h spent media) on LDLR levels in hepatocytes of KO (-/-) mice. No significant effect was observed on LDLR levels following 24h incubation (Fig. 3, supplemental Fig. S1). In contrast, incubation with 100 nM of purified human PCSK9 resulted in its internalization and a ~70% reduction in total LDLR. Accordingly, the accumulated PCSK9 in the 48h spent media of primary hepatocytes of WT mice (Fig. S1) was unable to influence the levels of LDLR in KO (-/-) hepatocytes.

Local effect of overexpressed PCSK9 on cell surface LDLR – PCSK9 was shown to specifically degrade the LDLR and two other family members, i.e., VLDLR and ApoER2, but not angiotensin converting enzyme 2 (26), nor the HDL receptor SR-BI, hepatocyte growth factor receptor HGFR, or transferrin receptor TfR (27). It was also previously shown that overexpression of PCSK9 in a rat hepatic cell line reduces the levels of LDLR mostly in transfected cells (<http://runews.rockefeller.edu/index.php?page=engine&id=48>) (15). Herein, a similar observation was also made in hepatic human HepG2 cells, transiently transfected with a bicistronic vector (pIRES-EGFP) that encodes separately wild-type (WT) hPCSK9 and EGFP proteins. At 24h post-transfection, immunocytochemistry revealed that cell surface LDLR protein levels (Fig. 4a, blue) were appreciably decreased in PCSK9-positive cells (Fig. 4a, green) relative to non-transfected adjacent cells. In contrast, HepG2 cells overexpressing the gain of function mutant D374Y, resulted in a decrease of LDLR levels in both transfected and neighboring cells (not shown). In order to quantify these observations, the cells were transfected either with a non-secreted catalytically inactive PCSK9 mutant (H226A) (5), WT or the D374Y variant (28). At 24h post-transfection, cells were sorted for EGFP and LDLR (Fig. S2). As compared to PCSK9-H226A expressing cells, the number of LDLR-negative cells increased by 4- and 6-

fold in cells overexpressing WT or D374Y PCSK9, respectively (GFP+, Fig. 4c). While the LDLR levels of adjacent, non-transfected cells were not affected by WT PCSK9, the number of LDLR-negative cells increased ~3-fold by the D374Y mutant (GFP-, Fig. 4d). Secreted PCSK9 from the ~20% transfected cells (quantified by an ELISA assay; (29) were ~3-fold those of endogenous levels (H226A media; Fig. 4b).

Compared to HepG2 cells, HEK293 cells exhibit a higher transfection efficiency (~75%) leading to the secretion of up to 1 µg/ml/24h (20 nM) of PCSK9. Similar to HepG2 cells, overexpression of WT PCSK9 in HEK293 cells resulted in a ~50% reduction of cell surface LDLR (GFP+; Fig. S3). As evidenced by FACS analysis, mixing of these cells with naïve ones, at various ratios, did not modify LDLR levels in the latter (GFP-; Fig. S3). Thus, after 24h incubation, in both HepG2 and HEK293 cells, overexpression of WT PCSK9 mainly reduces local cell surface LDLR levels, with little influence on adjacent cells. This suggests that at 24h post-transfection, overexpressed WT PCSK9 efficiently down-regulates local LDLR levels, either intracellularly or by an autocrine fashion.

Disruption of intracellular trafficking increases endogenous LDLR levels only in PCSK9-expressing cells - Clathrin-light chains CLCa and CLCb are not required for clathrin-mediated endocytosis, but are critical for clathrin-mediated trafficking between the trans Golgi network (TGN) and the endosomal system (19). Accordingly, KD of both isoforms in HepG2 cells (K_D CLCs) resulted in the clustering of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor, characteristic of disruption of the intracellular Golgi-lysosomal pathway (Fig. 5a, see arrows), as reported in other cell lines (19). At 72h post-transfection, HepG2 and HEK293 cell lysates were analyzed by Western blotting. The level of endogenous mature N- and O-glycosylated ~160 kDa LDLR protein (30) was increased by ~2.9-fold in HepG2 cells, endogenously expressing PCSK9, but not in HEK293 cells (PCSK9-negative (5)) (Fig. 5b,c). As controls, we also show that the levels of the transferrin receptor TfR (Fig. 5b) or PCSK9 (not shown) are not affected by KDCLCs. Analysis of HepG2 cells by immunocytochemistry revealed that the levels of both cell

surface (Fig. 5d) and intracellular (Fig. S4a) LDLR were heavily increased. Although KDCLCs resulted in higher LDLR levels, it did not significantly affect its overall subcellular localization (not shown). Furthermore, upon KDCLCs , LDLR endocytosis is functional as we observed an enhanced diI-LDL uptake (Fig. S4b), which correlates with the observed increased cell-surface LDLR (Fig. 5d). The observed effect on LDLR seems to be relatively rapid, since at 72h post- KDCLCs we can already see an increased rate of de novo biosynthesized LDLR in a 4h pulse with ^{35}S -Met/Cys (7), whereas non-target control siRNAs (siCtl) are ineffective (Fig. S5).

It was reported that KDCLCs can reduce the levels of endosomal/lysosomal degrading enzymes by preventing their normal trafficking and thus delaying their zymogen activation (19). Accordingly, KDCLCs may affect both intra- and extracellular pathways that presumably depend on similar lysosomal degrading enzymes. However, upon incubation of HepG2 cells with 40 nM of purified PCSK9 added 48h post- KDCLCs , and then allowing the cells to grow for another 24h did not affect its ability to degrade the LDLR (Fig. 5e). Thus, KDCLCs does not affect the extracellular LDLR degradation pathway induced by PCSK9.

To further substantiate the critical importance of PCSK9 in the regulation of LDLR levels upon KDCLCs , we generated stable pools of HepG2 cells expressing either a non-targeting or a PCSK9-specific shRNA. QPCR analyses revealed that one of the shPCSK9-expressing cellular pools (shPCSK9-2b) exhibits ~90% reduction in PCSK9 mRNA (not shown). Western blot analysis of the latter pool show a ~60% reduction in secreted PCSK9 protein levels, concomitant with a 1.6-fold increase in LDLR levels, but without any effect on the level of the control transferrin receptor (Fig. S6). In order to enrich for cells that express the highest level of shPCSK9, we further sorted the shPCSK9 expressing cells by FACS and selected for those expressing the highest level of LDLR. Such an LDLR-enriched shPCSK9* cellular pool exhibits virtually no PCSK9 (Fig. 5f). The increased LDLR levels observed upon KDCLCs was PCSK9-dependent, as it is no longer seen in

shPCSK9* (Fig. 5f). We conclude that in HepG2 cells, a relatively rapid, endogenous intracellular pathway exists for PCSK9-enhanced LDLR degradation.

Additive effects of K_D CLCs and LPDS treatment on LDLR levels - Exposure of cells to lipoprotein deficient media (LPDS), which are poor in cholesterol, results in an upregulation of both LDLR and PCSK9 mRNAs via a common SREBP-2 pathway (31). Accordingly, at 48h post-transfection of HepG2 cells with either control siRNA (-) or K_D CLCs (+), the cells were incubated overnight with complete media (FBS) or LPDS. Western blot analyses revealed that LPDS media resulted in a ~2- and ~1.5-fold upregulation of the endogenous protein levels of LDLR and PCSK9, respectively in the presence of control siRNA (-; Fig. 6). However, only LDLR levels were further increased by another ~2-fold upon K_D CLCs in LPDS versus FBS media, but not those of PCSK9 or transferrin receptor (+; Fig. 6). We conclude that incubation of cells in LPDS media coupled to a blockade of the intracellular trafficking by K_D CLCs results in an additive ~4-fold upregulation of LDLR levels.

3.4. DISCUSSION

The cell surface internalization of PCSK9 is primarily dependent on the presence of LDLR and the adaptor protein ARH that binds the cytosolic tail of the LDLR (16,32,33). In addition, we showed that LDLR and PCSK9 interact early in the secretory pathway (10) and questioned whether some LDLR=PCSK9 complex or PCSK9 alone can be targeted directly from the TGN to LE/L, without cycling through the cell surface. Aside from the extracellular pathway, the existence of an intracellular one is supported by the ability of PCSK9 to degrade the LDLR *in vivo* in the absence of ARH (9), and on the capability of PCSK9-Lamp1 chimeras, which directly traffic to LE/L, to efficiently enhance the degradation of the LDLR, VLDLR and ApoER2 (26). In liver, ARH seems to be critical for the endocytosis of the extracellular LDLR=PCSK9 complex (16), but does not seem to play an important role in regulating total levels of endogenous LDLR (Fig. 1d) (17,34).

Endogenous PCSK9 secreted from primary hepatocytes of WT mice has no effect on those derived from *Pcsk9*^{-/-} mice, while incubation with 100 nM PCSK9 clearly decreased LDLR levels (Fig. 3). Thus, following 24h incubations only high, non-physiological concentrations of WT PCSK9 can reduce LDLR levels in primary hepatocytes (Fig. 3) and in HepG2 cells (Figs. 1,5). Interestingly, we observed that in the plasma of *Ldlr*^{-/-} mice the level of circulating PCSK9 and its Furin-cleaved form (20) are at least 10-fold higher than in WT mice (Fig. S1b), and yet it was reported that sharing the blood circulation (parabiosis) of *Ldlr*^{-/-} mice with that of WT ones did not affect the levels of liver LDLR in the latter, nor plasma LDL-C (16). Accordingly, the physiological role of circulating WT PCSK9 and its Furin-truncated form remain undefined. While hepatocyte-specific transgenic mice weakly overexpressing PCSK9 (3-fold) exhibit no significant change in circulating LDL-C, a ~30-fold overexpression increased it by ~5-fold (20). Data from transgenic mice expressing very high levels of human PCSK9 in mouse kidney (35) or liver (16), or continuous infusions of recipient WT mice with recombinant PCSK9 (36) indicated that >100 nM amounts of circulating PCSK9 are required to significantly affect liver LDLR protein levels, without affecting extra-hepatic LDLR. In that context, we recently showed that annexin A2 inhibits the effect of extracellular PCSK9 on LDLR, and in view of its absence from hepatocytes *in vivo*, it may exert its inhibitory effect in extra-hepatic tissues (14). The available compiled data suggest that only supra-physiological levels of circulating PCSK9 have an impact on liver LDLR. Several ELISAs evaluated the level of circulating human PCSK9 to be ~2-4 nM (16,29,37). However, since the local concentration of PCSK9 secreted from hepatocytes into the extracellular microenvironment is expected to be much higher than in plasma, PCSK9 may well have an autocrine/paracrine effect *in vivo*.

Our data revealed that a 4h incubation of HepG2 cells with an EGF-AB peptide readily inhibits the LDLR-degrading activity of exogenously added PCSK9, but had little effect on endogenous secreted PCSK9 (Fig. 2a). Interestingly, it took at least 24h to detect

an effect of EGF-AB on LDLR levels and activity (Fig. 2b,c). Thus, it is possible that the extracellular PCSK9 effect is a relatively slow process and may require a long incubation time and/or a critical threshold concentration. This may be related to the lower binding affinity of PCSK9 to LDLR at neutral versus acidic pHs (11).

While this manuscript was being put together, a very recent report revealed that a monoclonal antibody (mAb) that neutralizes the interaction of PCSK9 and LDLR is able to reduce the extracellular activity of PCSK9 both in naïve HepG2 cells and in vivo in mouse and cynomolgus monkey (38). Similar to our data in HepG2 cells using EGF-AB as a neutralizing agent (Fig. 2), the mAb effect was only reported for times > 24h incubation. The latter seems to be due to a conformational change as the mAb does not completely mask the PCSK9-LDLR interaction surface (38). Since no evidence was provided for antibody-antigen cellular internalization, we presume that the mAb blocks the extracellular PCSK9 effect on LDLR.

Herein, we showed that overexpression of PCSK9 or its D374Y mutant in HepG2 cells effectively reduces cell-surface LDLR levels within 24h. In contrast, only the D374Y mutant affects the levels of LDLR in non-transfected neighboring cells (Fig. 4), in agreement with its reported enhanced LDLR-binding affinity at neutral pH (11,18,23). Concentrations of secreted PCSK9, up to 12 nM (HepG2 cells; ~3x endogenous levels; Fig. 4) or 20 nM (HEK293 cells; Fig. S3), were unable to enhance the degradation of the LDLR on neighboring cells in 24h. This suggests that within 24h and at levels close to endogenous ones, PCSK9 exerts its function mostly intracellularly and/or in an autocrine fashion.

Our previous work demonstrated the importance of clathrin heavy chain for the PCSK9-dependent degradation of the LDLR (10). However, since clathrin-mediated membrane trafficking is needed for both direct sorting from the TGN to LE/L and internalization of cargo by endocytosis, the route taken by the LDLR=PCSK9 complex remained unresolved. In the present work, our data support the presence of a relatively rapid intracellular route for the PCSK9-induced degradation of LDLR at endogenous levels,

since blockade of the TGN to lysosomes vesicular trafficking by κ DCLCs clearly upregulated LDLR levels already after 4h (Fig. S5), without affecting endocytosis (Fig. 5, S4b). Even though the κ DCLCs slows down the activation of pro-cathepsin D (19), a lysosomal hydrolase that is targeted to LE/L, our results also showed that after κ DCLCs, the cognate hydrolases retained their capacity to degrade the LDLR (Fig. 5e). In addition, we also demonstrated that the effect of κ DCLCs is PCSK9-dependent, as LDLR levels are no longer affected when PCSK9 is absent (Fig. 5f). Although the level of LDLR is increased, its intracellular and surface localization remained comparable in cells lacking CLCs (Fig. S4a). Similarly, intracellular and secreted levels as well as the localization of PCSK9 were not significantly altered by κ DCLCs (not shown). Thus, while the underlying mechanism of CLCs effect is presently not fully unraveled, it may rely on another factor that is essential for the direct intracellular trafficking of PCSK9 to the LDLR degradation compartment(s).

PCSK9 has emerged as a viable attractive target to reduce coronary heart disease through control of dyslipidemias (39). The choice of the best approach to effectively diminish the effect of PCSK9 on LDLR degradation in vivo may be influenced by the relative contribution of both cellular pathways under physiological and pathological conditions. The combination of a statin with an agent that blocks either the extracellular pathway (38) or the intracellular one (present work) or both would constitute a powerful novel approach to control hypercholesterolemia. With the rapid pace of discoveries in the field, it is hoped that in a few years lead molecules reducing the level and/or activity of PCSK9 will be uncovered, and that these will find their way in clinical trials to assess their potency and safety.

FOOTNOTES

We are grateful to R. Essalmani, S. Benjannet, M. Dupuis and E. Massicotte, D. Meyers, and G. Duke for excellent technical advice and help. We are also thankful to J. Davignon, G. Dubuc and M. Tremblay for the ELISA assays, V. Franklin and Y. Marcel for advice on primary hepatocytes. Many thanks to all members of the Seidah laboratory

for helpful discussions and to Brigitte Mary for editorial assistance. This research was supported by CIHR grants MOP-36496 and # CTP-82946 (NGS) and MOP-15396 (PSM), a Strauss Foundation grant (NGS), A Bristol-Myers Squibb research grant, and a Canada Chair # 201652 (NGS). S. Poirier was supported by a doctoral CIHR fellowship.

The abbreviations used are: ARH, autosomal recessive hypercholesterolemia; CLC, clathrin-light chain; EGF-AB, epidermal growth factor domains AB; EGFP, enhanced green fluorescent protein; FACS, fluorescence-activated cell sorting; KD, knockdown; KO, knockout; KD; LE/L, late endosomes/lysosomes; LDLR, low-density lipoprotein receptor; LPDS, lipoprotein deficient serum; PCSK9, proprotein convertases subtilisin kexin 9; WT, wild type.

3.5. FIGURE LEGENDS

FIG.1. Minor contribution of endogenous secreted PCSK9 to LDLR intracellular degradation. (a) HepG2 cells were incubated for 4h with 0.3% v/v of DMSO (vehicle) or 80 μ M of Dynasore monohydrate, a cell-permeable inhibitor of dynamin together with 4 μ g/ml of diI-LDL (red) and analyzed by immunocytochemistry. (b) After 6h incubation with DMSO or 80 μ M of Dynasore, protein extracts were analyzed by Western blotting. (c) Immunocytochemistry of non-permeabilized HepG2 cells that were transfected with either a non-silencing siRNA (siCtl) or an ARH siRNA at 72h post-transfection. Arrows emphasize the increased cell surface LDLR. (d) At 72h post-transfection, protein extracts were analyzed by Western blotting. These data are representative of 3-6 separate experiments. Scale bars = 20 μ m.

FIG.2. Extracellular EGF-AB does not affect endogenous PCSK9 effect on LDLR. HepG2 cells were pre-incubated for either (a) 4h or (b) 24h with 0.01, 0.1, 0.3, 1, 3 and 10 μ M EGF-AB peptide together with 0, 67, 135 or 200 nM of pure human PCSK9. Then, 5 μ g/ml of diI-LDL was added and the incubation continued for another 2h. Cells were washed and analyzed for fluorescence incorporation. Normalized data are presented. (c) Western blot analyses of HepG2 cells incubated for 24h with 0, 1, 5 and 12.5 μ M EGF-AB. These data are representative of 3 independent experiments.

FIG.3. Secreted PCSK9 does not reduce LDLR levels in PCSK9 KO hepatocytes. Primary hepatocytes of *Pcsk9*^{-/-} (-/-) mice were incubated for 24h in duplicate with either 100 nM PCSK9, or with 48h conditioned media from PCSK9 KO or WT hepatocytes (from 2 mice, WT1 and WT2). Note the lower LDLR levels in *Pcsk9*^{+/+} (+/+) hepatocytes, the source of WT media, versus (-/-) hepatocytes. Western blot analyses of LDLR, human PCSK9 and β -actin are shown. Note the level of cell-associated human PCSK9 following the 100 nM incubation using a human PCSK9 antibody that does not recognize mouse PCSK9 on Western blots (20). Similar data were obtained in 2 separate experiments.

FIG.4. The gain of function mutant PCSK9-D374Y, but not WT PCSK9, decreases cell surface LDLR on adjacent cells. (a) Immunocytochemistry of cell surface LDLR (blue) in HepG2 transiently overexpressing a bicistronic vector (pIRES) encoding WT PCSK9 and EGFP (green). (b-d) At 24h post-transfection, cells overexpressing a non-secreted catalytically inactive PCSK9 (H226A), WT, or the gain of function mutant (D374Y) were sorted for EGFP and LDLR. Graphs were derived from FACS analyses (Figure S1), and values normalized to those of the H226A-expressing cells. Secreted human PCSK9 levels were measured using an ELISA assay (b). Error bars represent three separate experiments. Scale bar = 20 μ m.

FIG.5. KD of CLCs increases endogenous LDLR levels only in PCSK9 expressing cells. HepG2 or HEK293 cells were transiently transfected with either a non-silencing siRNA (siCtl) or with siRNAs against both clathrin light chain (CLC) a and b isoforms (siCLCa+b). (a) Immunocytochemistry analyses confirmed that KDCLCs (green) results in the clustering of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor, characteristic of disruption of the intracellular Golgi-lysosomal pathway (blue; see arrows). (b,c) At 72h post-transfection, HepG2 and HEK293 cells were analyzed by Western blotting. (d) Immunocytochemistry under non-permeabilizing conditions of cell surface LDLR (green) upon KDCLCs (siCLCa+b) as compared to non-silencing siRNA transfected cells (siCtl). (e) At 48h post-transfection, addition of 40 nM exogenous PCSK9 enhances the degradation of LDLR irrespective of KDCLCs . (f) Effect of KDCLCs on LDLR protein levels in HepG2 cells with (shNT) or without (shPCSK9*) endogenous PCSK9. The 160 kDa band representing mature LDLR was quantified and normalized with those of actin. These data are representative of 3-6 independent experiments. Scale bars = 20 μ m.

FIG.6. Synergic effect of KDCLCs with LPDS treatment. HepG2 were transiently transfected with either a non-silencing siRNA (siCtl) or with siRNAs against both clathrin light chain (CLC) a and b isoforms (siCLCa+b). At 48h post-transfection cells were washed 2 times with DMEM media and incubated with either complete (10% FBS) or with a lipoprotein deficient serum media (5% LPDS) (a) After 24h incubation, cells were washed and incubated 6h in DMEM and protein extracts and media were analyzed by Western blotting. These data are representative of 3 independent experiments.

FIG.S1. Levels of PCSK9 in mouse hepatocytes and plasma. Immunoprecipitation followed by Western blot analysis of mouse PCSK9 (20): (a) secreted from primary hepatocytes of KO and WT mice, as compared to immunoprecipitation of 100 nM pure human PCSK9, used in Figure 5. This reflects the fact that levels of secreted PCSK9 from primary hepatocytes in 48h are much lower than 5 μ g (100 nM). (b) Circulating PCSK9 in the plasma of *Ldlr*^{+/+} or *Ldlr*^{-/-} mice (pool of 3 mice each). Note the presence of the Furin-cleaved form (PCSK9 Δ N221), and the much higher levels of PCSK9 in *Ldlr*^{-/-} mouse plasma.

FIG.S2. Raw data from FACS analyses of HepG2 cells overexpressing PCSK9. As described in Figure 1, HepG2 cells were transiently transfected with the non-secreted inactive site mutant (pIR-PCSK9-H226A), pIR-PCSK9-WT or the gain of function mutant (pIR-PCSK9-D374Y). 24h post-transfection, cells were sorted both for EGFP (PCSK9-expressing cells; GFP+/-) and cell surface LDLR. The plots are representative of three separate experiments. To evaluate the loss of cell surface LDLR, LDLR- events were divided by the total of the corresponding GFP areas (GFP+ or GFP-). As reported (5), overexpression of catalytically inactive PCSK9 (pIR-PCSK9-H226A) is not secreted and was used for normalization. The data are representative of 3 separate experiments.

FIG.S3. Overexpression of PCSK9 in HEK293 cells did not affect cell surface LDLR on adjacent, un-transfected cells. HEK293 cells were transiently transfected with pIR-PCSK9-WT. At 24h post-transfection, different ratios (panels 1-5) of non-transfected and PCSK9-transfected cells were mixed, keeping a total of 1×10^6 cells. (a) For each ratio, cells were sorted using a fixed gating of 104 events of naive cells (GFP-). (b) For each condition are represented: the % of transfected and non-transfected cells, concentration (nM) of secreted PCSK9, and % of LDLR-negative cells among GFP+ or GFP- cells. This is a representative experiment of 2 separate ones.

FIG.S4. κ DCLCs in HepG2 cells increase LDLR levels without inhibition of LDLR endocytosis. (a) 72h post-transfection, Permeabilized HepG2 cells were stained with antibodies to clathrin light chains (CLC; red) or LDLR (green). Arrows point to the cell surface and perinuclear region. This is a representative experiment of 2 separate ones. [b] HepG2 cells were transiently transfected with either a non-silencing siCtl or with siCLCa+b. At 72h post-transfection, cells were incubated for 2h with 4 μ g/ml of diI-LDL. Immunocytochemistry revealed that upon κ DCLCs (green), LDL endocytosis was increased, as illustrated by intracellular uptake of diI-LDL (red). This is a representative experiment of 3 separate ones. Scale bars = 20 μ m.

FIG.S5. De novo biosynthesis of LDLR upon κ DCLCs. HepG2 were transiently transfected with either a non-silencing siRNA (siCtl) or with siRNAs against both clathrin light chain (CLC) a and b isoforms (siCLCa+b). At 72h post-transfection, non-transfected HepG2 cells (mock) or transfected cells were washed 2 times with DMEM media and incubated for 4h with 35 S-Met/Cys. Then, LDLR was immunoprecipitated and analyzed by autoradiography. These data are representative of 2 independent experiments.

FIG.S6. Western blotting of selected stable pools of shRNA-expressing HepG2 cells. Analysis of 1 or 2 cellular pools expressing no shRNA (pLKO, empty vector), shNT (non-target shRNA) or two different shRNAs against PCSK9 (shPCSK9-1 or 2). For most

shRNA constructs, two separate pools were generated (a or b). The comparative analysis of LDLR, PCSK9 (normalized to β -actin), and transferrin receptor (TfR) are shown.

3.6. REFERENCES

1. Lloyd-Jones, D., Adams, R., Carnethon, M., De Simone, G., Ferguson, T. B., Flegal, K., Ford, E., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Nichol, G., O'Donnell, C., Roger, V., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Stafford, R., Steinberger, J., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N., Wylie-Rosett, J., and Hong, Y. (2009) *Circulation* 119, e21-181
2. Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1986) *Science* 232, 34-47
3. Varret, M., Abifadel, M., Rabes, J. P., and Boileau, C. (2008) *Clin. Genet.* 73, 1-13
4. Seidah, N. G. and Prat, A. (2007) *J. Mol. Med.* 85, 685-696
5. Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., and Chretien, M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 928-933
6. Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derre, A., Villegier, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J. M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N. G., and Boileau, C. (2003) *Nat. Genet.* 34, 154-156
7. Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M. C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D., Trillard, M., Abifadel, M., Tebon, A., Attie, A. D., Rader, D. J., Boileau, C., Brissette, L., Chretien, M., Prat, A., and Seidah, N. G. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 48865-48875
8. Maxwell, K. N., Fisher, E. A., and Breslow, J. L. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 2069-2074

9. Park, S. W., Moon, Y. A., and Horton, J. D. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 50630-50638
10. Nassoury, N., Blasiolo, D. A., Tebon, O. A., Benjannet, S., Hamelin, J., Poupon, V., McPherson, P. S., Attie, A. D., Prat, A., and Seidah, N. G. (2007) *Traffic.* 8, 718-732
11. Cunningham, D., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Griffor, M. C., Hawkins, J. L., Subashi, T. A., Varghese, A. H., Ammirati, M. J., Culp, J. S., Hoth, L. R., Mansour, M. N., McGrath, K. M., Seddon, A. P., Shenolikar, S., Stutzman-Engwall, K. J., Warren, L. C., Xia, D., and Qiu, X. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 413-419
12. Kwon, H. J., Lagace, T. A., McNutt, M. C., Horton, J. D., and Deisenhofer, J. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 1820-1825
13. Zhang, D. W., Garuti, R., Tang, W. J., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 13045-13050
14. Mayer, G., Poirier, S., and Seidah, N. G. (2008) *J Biol. Chem.* 283, 31791-31801
15. Maxwell, K. N. and Breslow, J. L. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 7100-7105
16. Lagace, T. A., Curtis, D. E., Garuti, R., McNutt, M. C., Park, S. W., Prather, H. B., Anderson, N. N., Ho, Y. K., Hammer, R. E., and Horton, J. D. (2006) *J Clin. Invest* 116, 2995-3005
17. Jones, C., Hammer, R. E., Li, W. P., Cohen, J. C., Hobbs, H. H., and Herz, J. (2003) *J Biol. Chem.* 278, 29024-29030
18. McNutt, M. C., Kwon, H. J., Chen, C., Chen, J. R., Horton, J. D., and Lagace, T. A. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 10551-10570

19. Poupon, V., Girard, M., Legendre-Guillemain, V., Thomas, S., Bourbonniere, L., Philie, J., Bright, N. A., and McPherson, P. S. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 168-173
20. Zaid, A., Roubtsova, A., Essalmani, R., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Hamelin, J., Tremblay, M., Jacques, H., Jin, W., Davignon, J., Seidah, N. G., and Prat, A. (2008) *Hepatology* 48, 646-654
21. Wang, M. D., Franklin, V., Sundaram, M., Kiss, R. S., Ho, K., Gallant, M., and Marcel, Y. L. (2007) *J Biol. Chem.* 282, 22525-22533
22. Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., and Kirchhausen, T. (2006) *Dev. Cell* 10, 839-850
23. Bottomley, M. J., Cirillo, A., Orsatti, L., Ruggeri, L., Fisher, T. S., Santoro, J. C., Cummings, R. T., Cubbon, R. M., Lo, S. P., Calzetta, A., Noto, A., Baysarowich, J., Mattu, M., Talamo, F., De Francesco, R., Sparrow, C. P., Sitlani, A., and Carfi, A. (2009) *J Biol. Chem.* 284, 1313-1323
24. Shan, L., Pang, L., Zhang, R., Murgolo, N. J., Lan, H., and Hedrick, J. A. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 69-73
25. Rashid, S., Curtis, D. E., Garuti, R., Anderson, N. N., Bashmakov, Y., Ho, Y. K., Hammer, R. E., Moon, Y. A., and Horton, J. D. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 5374-5379
26. Poirier, S., Mayer, G., Benjannet, S., Bergeron, E., Marcinkiewicz, J., Nassoury, N., Mayer, H., Nimpf, J., Prat, A., and Seidah, N. G. (2008) *J. Biol. Chem.* 283, 2363-2372
27. Labonte, P., Begley, S., Guevin, C., Asselin, M. C., Nassoury, N., Mayer, G., Prat, A., and Seidah, N. G. (2009) *Hepatology* 50, 17-24

28. Timms, K. M., Wagner, S., Samuels, M. E., Forbey, K., Goldfine, H., Jammulapati, S., Skolnick, M. H., Hopkins, P. N., Hunt, S. C., and Shattuck, D. M. (2004) *Hum. Genet.* 114, 349-353
29. Dubuc, G., Tremblay, M., Pare, G., Jacques, H., Hamelin, J., Benjannet, S., Boulet, L., Genest, J., Bernier, L., Seidah, N. G., and Davignon, J. (2009) *J. Lipid Res.* (in press)
30. Cummings, R. D., Kornfeld, S., Schneider, W. J., Hobgood, K. K., Tolleshaug, H., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 15261-15273
31. Dubuc, G., Chamberland, A., Wassef, H., Davignon, J., Seidah, N. G., Bernier, L., and Prat, A. (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1454-1459
32. Cameron, J., Holla, O. L., Ranheim, T., Kulseth, M. A., Berge, K. E., and Leren, T. P. (2006) *Hum. Mol. Genet.* 15, 1551-1558
33. Qian, Y. W., Schmidt, R. J., Zhang, Y., Chu, S., Lin, A., Wang, H., Wang, X., Beyer, T. P., Bensch, W. R., Li, W., Ehsani, M. E., Lu, D., Konrad, R. J., Eacho, P. I., Moller, D. E., Karathanasis, S. K., and Cao, G. (2007) *J. Lipid Res.* 48, 1488-1498
34. Harada-Shiba, M., Takagi, A., Marutsuka, K., Moriguchi, S., Yagyu, H., Ishibashi, S., Asada, Y., and Yokoyama, S. (2004) *Circ. Res.* 95, 945-952
35. Luo, Y., Warren, L., Xia, D., Jensen, H., Sand, T., Petras, S., Qin, W., Miller, K. S., and Hawkins, J. (2008) *J. Lipid Res.* 49, 1581-1588
36. Grefhorst, A., McNutt, M. C., Lagace, T. A., and Horton, J. D. (2008) *J. Lipid Res.* 49, 1303-1311
37. Alborn, W. E., Cao, G., Careskey, H. E., Qian, Y. W., Subramaniam, D. R., Davies, J., Conner, E. M., and Konrad, R. J. (2007) *Clin. Chem.* 53, 1814-1819

38. Chan, J. C., Piper, D. E., Cao, Q., Liu, D., King, C., Wang, W., Tang, J., Liu, Q., Higbee, J., Xia, Z., Di, Y., Shetterly, S., Arimura, Z., Salomonis, H., Romanow, W. G., Thibault, S. T., Zhang, R., Cao, P., Yang, X. P., Yu, T., Lu, M., Retter, M. W., Kwon, G., Henne, K., Pan, O., Tsai, M. M., Fuchslocher, B., Yang, E., Zhou, L., Lee, K. J., Daris, M., Sheng, J., Wang, Y., Shen, W. D., Yeh, W. C., Emery, M., Walker, N. P., Shan, B., Schwarz, M., and Jackson, S. M. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 9820-9825
39. Seidah, N. G. (2009) *Expert. Opin. Ther. Targets*. 13, 19-28

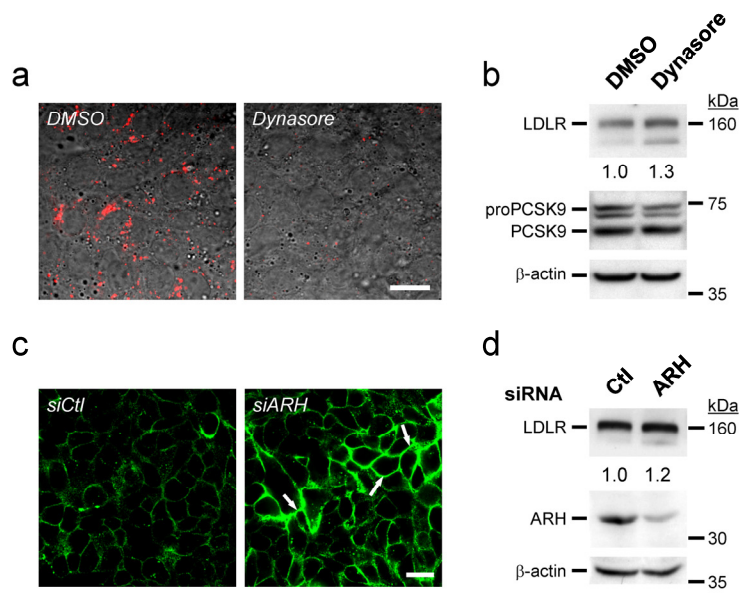


Fig.1

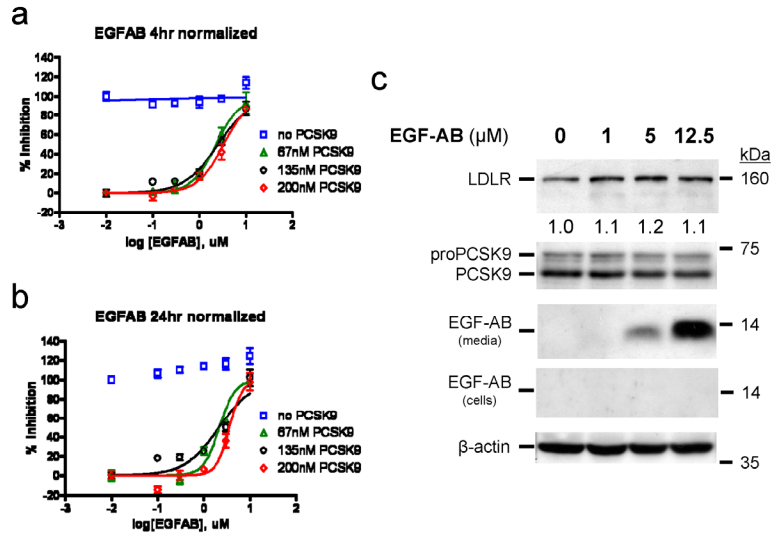


Fig.2

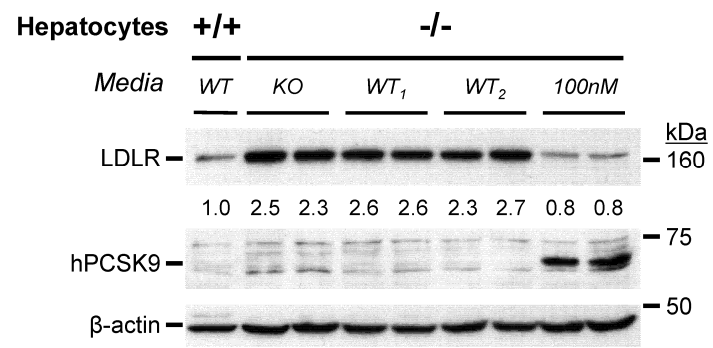


Fig.3

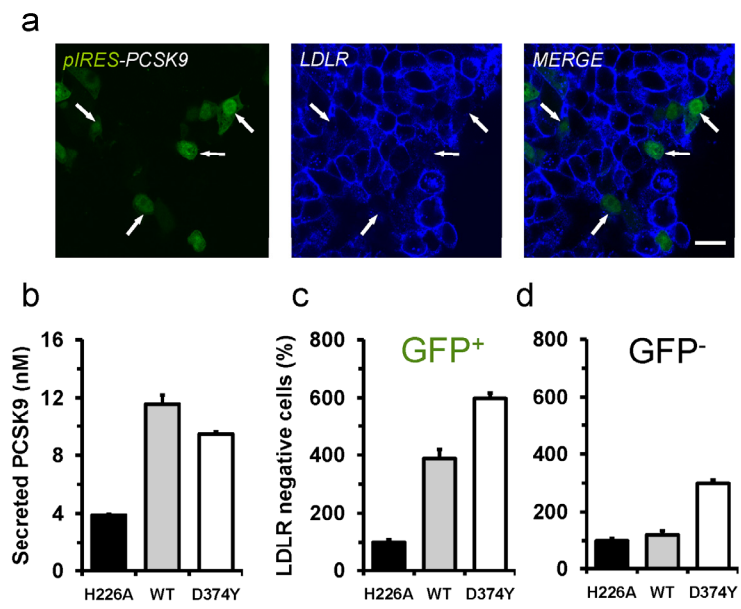


Fig.4

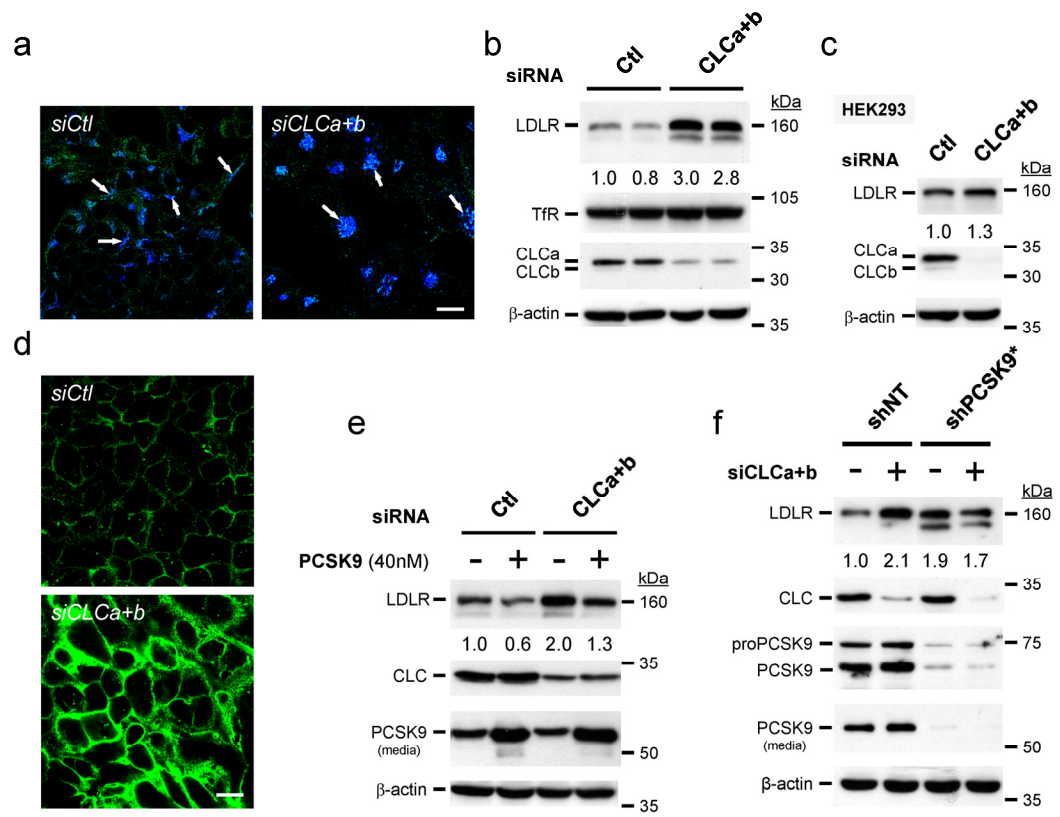


Fig.5

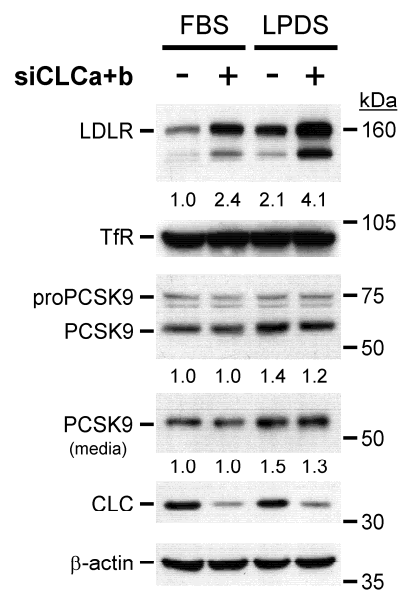


Fig.6

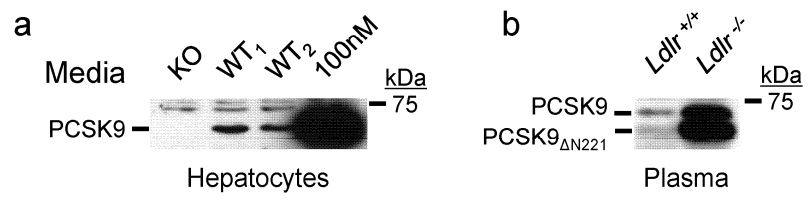


Fig.S1

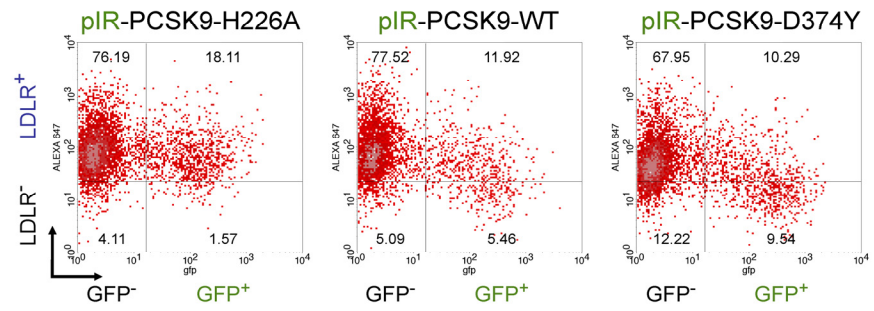


Fig.S2

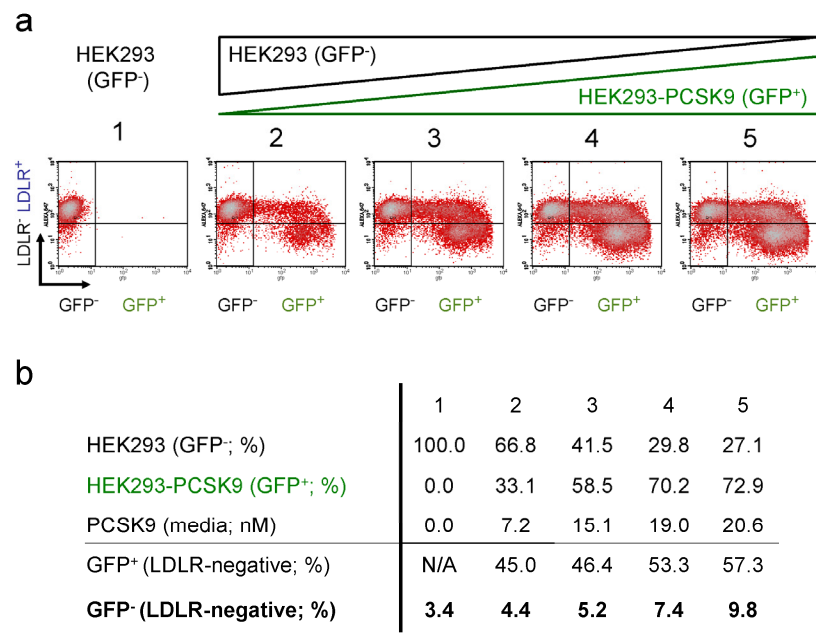


Fig.S3

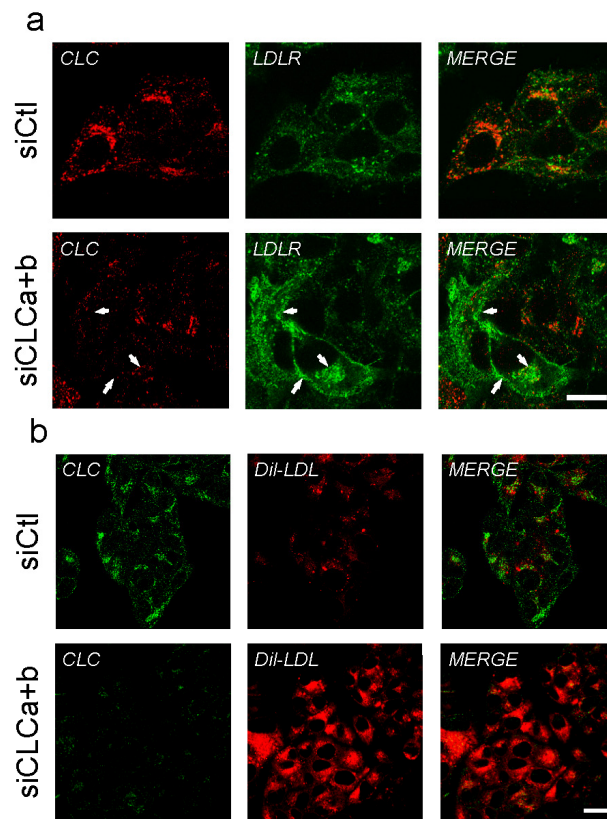


Fig.S4

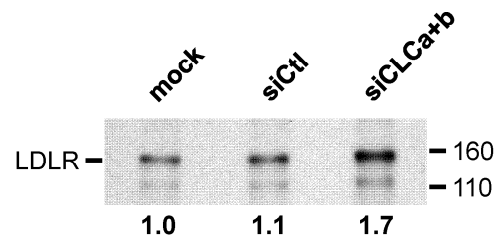


Fig.S5

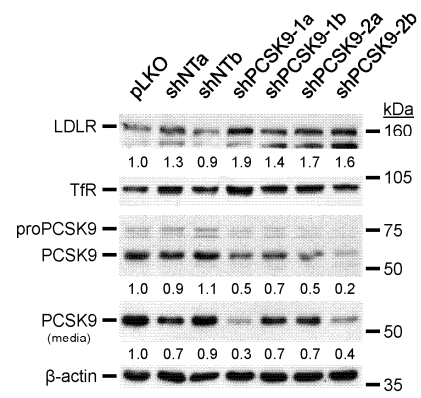


Fig.S6

Chapitre IV: Article 3

Titre : *Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels*

Auteurs : Gaétan Mayer, Steve Poirier et Nabil G. Seidah.

Journal : *Journal of Biological Chemistry, Vol. 283, No. 46, pp. 31791-31801.*

Contribution : conceptualisation (30%); optimisation et expérimentation (30%); rédaction (30%)

Pertinence

Il est maintenant incontestable que PCSK9 soit une nouvelle cible thérapeutique de premier choix pour contrer l'hypercholestérolémie familiale et les MCV.^{135, 137} Depuis sa découverte en 2003¹²⁶, il fut répertorié que des patients ayant des mutations dysfonctionnelles pour PCSK9 ont une forte baisse du LDL-cholestérol circulant corrélée avec une réduction de 88% du risque de MCV sans aucun effet secondaire apparent.²⁷³ De plus, il est à noter que, chez l'adulte, l'expression de PCSK9 est localisée dans des centres cholestérogéniques tels le foie, l'intestin et le rein ce qui lui confère davantage de potentiel clinique.¹²⁶ Certaines équipes ont entrepris d'atténuer l'activité de PCSK9 par diverses approches soit par interférence à l'ARN ou par l'utilisation d'anticorps dirigés contre la surface d'interaction PCSK9•LDLR.²⁶⁴⁻²⁶⁶ Lorsqu'utiliser de manière ponctuelle, l'inhibition artificielle de PCSK9, chez des primates, a montré une forte réduction du LDL-cholestérol circulant maintenue sur plus de 7 jours.

Par immunobuvardage d'affinité, cet article a permis d'identifier la protéine Annexine A2 (AnxA2) comme interagissant avec le domaine C-terminal de PCSK9. De plus, nous avons démontré que l'ajout d'AnxA2 prévient la dégradation du LDLR induit par la présence e PCSK9. Jusqu'à présent, cette étude est l'unique évidence qu'il existe un inhibiteur endogène capable de masquer l'action de PCSK9 sur le LDLR. Par mutagenèse dirigée, nous avons cartographié que les acides aminés essentiels pour l'interaction PCSK9•AnxA2 résident dans le domaine R1 (acides aminés 34-108). Situé en aval de la région fonctionnelle de l'AnxA2, nous pouvons prédire que l'utilisation du domaine R1 (ou par peptidomimétique) de l'AnxA2 possède un fort potentiel inhibiteur pour PCSK9 qui serait sans conséquence dans les fonctions propres connues de cette protéine.²⁷⁴



Title: Annexin A2 Is a C-terminal PCSK9-binding Protein That Regulates Endogenous Low Density Lipoprotein Receptor Levels

Author: Gaétan Mayer, Steve Poirier, Nabil G. Seidah

Publication: Journal of Biological Chemistry

Publisher: The American Society for Biochemistry and Molecular Biology

Date: Nov 14, 2008

Copyright © 2008, by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology

Logged in as:
Steve Poirier

LOGOUT

Non-profit/Non-commercial Use

For **Non-profit/Non-commercial** uses: You are free to copy, distribute, transmit and to adapt the work under the following conditions:

Attribution. You must attribute the work in the manner specified by the author or licensor (but not in any way that suggests that they endorse you or your use of the work).

Non-commercial. You may not use the work for commercial purposes; including original authors reusing content by a commercial publisher.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2010 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#)
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

**ANNEXIN A2 IS A C-TERMINAL PCSK9 BINDING PROTEIN THAT
REGULATES ENDOGENOUS LDL RECEPTOR LEVELS**

Gaétan Mayer‡, Steve Poirier‡, and Nabil G. Seidah‡¶

‡ Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of

Montreal, 110 Pine avenue West, Montréal, QC, Canada H2W 1R7

Running title: Annexin A2 is an Endogenous Inhibitor of PCSK9 Function

¶To whom correspondence should be addressed: Nabil G. Seidah: Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Avenue West Montreal, QC H2W 1R7, Canada. Tel: (514) 987-5609; Fax: (514) 987-5542

The proprotein convertase subtilisin/kexin-type 9 (PCSK9), which promotes degradation of the hepatic low density lipoprotein receptor (LDLR), is now recognized as a major player in plasma cholesterol metabolism. Several gain-of-function mutations in PCSK9 cause hypercholesterolemia and premature atherosclerosis and thus, inhibition of PCSK9-induced degradation of the LDLR may be used to treat this deadly disease. Herein, we discovered an endogenous PCSK9 binding partner by Far Western blotting, co-immunoprecipitation and pull-down assays. Following 2D gel electrophoresis and mass spectrometry analysis we demonstrated that PCSK9 binds to a ~33 kDa protein identified as Annexin A2 (AnxA2), but not to the closely related Annexin A1. Furthermore, our functional LDLR assays and shRNA studies show that AnxA2 and the AnxA2/p11- complex could prevent PCSK9-directed LDLR degradation in HuH7, HepG2 and CHO cells. Immunocytochemistry revealed that PCSK9 and AnxA2 co-localize at the cell surface indicating a possible competition with the LDLR. Structure-function analyses demonstrated that the C-terminal cysteine-histidine rich domain of PCSK9 interacts specifically with the N-terminal repeat R1 of AnxA2. Mutational analysis of this 70

amino acid long repeat indicated that the RRTKK⁸¹ sequence of AnxA2 is implicated in this binding as its mutation to AATAA⁸¹ prevents its interaction with PCSK9. To our knowledge, this work constitutes the first to show that PCSK9 activity on LDLR can be regulated by an endogenous inhibitor. The identification of the minimal inhibitory sequence of AnxA2 should pave the way towards the development of PCSK9 inhibitory lead molecules for the treatment of hypercholesterolemia.

4.1. INTRODUCTION

The proprotein convertase subtilisin kexin-like 9 (PCSK9) is the 9th member of a family of secretory serine proteinases known as the proprotein convertases (PCs) (1;2). It is now recognized as a major candidate gene for the development of pharmacologically relevant inhibitors or silencers, as it induces an enhanced cellular degradation of the low density lipoprotein receptor (LDLR) in endosomes-lysosomes (3;4). An increased activity of PCSK9 would thus result in an upregulation of the level of circulating LDL-cholesterol, one of the major cause leading to atherosclerosis and coronary heart disease (5;6). Indeed, the PCSK9 gene represents the third chromosomal locus of dominant familial hypercholesterolemia (7), as was recently reconfirmed in two genome wide screens (8;9) and a liver specific screen (10). Both gain and loss of function mutations have been reported for PCSK9 resulting in hyper- and hypocholesterolemia, respectively (11). PCSK9 transgenic and knockout mice recapitulated these phenotypes (12;13).

Following autocatalytic cleavage, PCSK9 exits the endoplasmic reticulum (ER) complexed with its prosegment, and is efficiently secreted (1). This secreted form can be internalized into endosomes via cell surface binding in an LDLR-dependent manner (14), and is able to degrade the cell surface LDLR (15). Alternatively, PCSK9 may enter endosomes directly from the Golgi (16;17). PCSK9 co-localizes with LDLR in early and late endosomes (14). It was also demonstrated that the C-terminal Cys/His rich domain

(CHRD) and the prosegment of PCSK9 are critical for the co-localization of PCSK9 and the LDLR (14).

The zymogen proPCSK9 is autocatalytically converted into an inactive prosegment-PCSK9 complex in the ER (1;3), and so far the only PCSK9 substrate known is itself. PCSK9 is the sole PC that is secreted as a catalytically inhibited prosegment-PC complex (1;3;18). Accordingly, the enhanced degradation of the LDLR (3;4;16), VLDLR and ApoER2 (19) in endosomes/lysosomes (14) induced by PCSK9 does not seem to require its catalytic activity (18;20). This intriguing twist in the function of this convertase is supported by the crystal structure of PCSK9, which revealed an extended tight binding complex of the enzyme and its inhibitory prosegment (21). This complex binds the EGF-A domain of the LDLR (22;23), with increasing strength at acidic pHs similar to those of endosomes/lysosomes (21), leading to its degradation by resident hydrolases.

The wide interest in developing a specific PCSK9-inhibitor/silencer led to the proposal of multiple approaches. One of these depends on the identification of inhibitors/modulators of the PCSK9-LDLR interaction (23). However, focusing only on the site of the PCSK9-LDLR interaction may be too restrictive. Indeed, natural point mutations of PCSK9 in remote domains also result in either hyper- or hypo-cholesterolemia (11), even though they are not implicated in the direct interaction of the catalytic domain with the LDLR/EGF-A (23). These include the hypercholesterolemic mutants S127R (prosegment) and H553R (CHRD) as well as the hypocholesterolemic variants R46L (prosegment), and Q554E (CHRD), resulting in gain or loss of function of PCSK9, respectively (7;11;24;25). It was therefore possible that endogenous modulators of PCSK9 function on LDLR may exist, which could specifically interact with the prosegment, the catalytic domain or the CHRD.

Accordingly, we set up a Far Western screen to identify such a modulator(s) in cell line extracts. Our extended analysis revealed that such a protein does exist in certain cells and that it interacts specifically with the CHRD, resulting in loss of function, i.e., decreased

ability of PCSK9 to enhance the degradation of LDLR. Herein, we describe the identification and properties of this endogenous PCSK9 modulator, as well as its domain that interacts with the CHR1.

4.2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

Expression Constructs – Human PCSK9 and mutant cDNAs and domains thereof were cloned, with or without a C-terminal V5 tag, into pIRES2-EGFP vector (Clontech) as previously described (3;26). The cDNAs coding for mouse PC5A-V5 (27) and pCi-hLDLR (3), were previously reported. The cDNA encoding for p11-YFP was kindly provided by Dr Volker Gerke (Institute of Medical Biochemistry, University of Muenster, Germany). Wild type human Annexin A2 (AnxA2) (ATCC #MGC-2257) and Annexin A1 (AnxA1) (ATCC #MGC-5095) were purchased from ATCC and subcloned into NheI/SacI digested pIRES2-EGFP vector. An HA epitope (YPYDVPDYA) was fused by PCR mutagenesis at the C-terminus of both AnxA1 and AnxA2. All oligonucleotides used in the various AnxA2 constructions are listed in supplemental Table S1. Two-steps PCRs were performed on AnxA2 cDNA to introduce point mutations (⁷⁷RRTKK>AATAK;⁷⁷RRTKK>AATAA; ⁷⁷RRTKKELASALK>⁷⁷AATAAELASALA; ⁸⁰KKELA>GKPLD), or amino acid (aa) deletions (Δ 2-24, aa 2-24; Δ R1, aa 37-108; Δ R2, aa 109-192; Δ R3, aa 193-268; Δ R4, aa 269-339) into pIRES2-AnxA2-EGFP vector (see Table S1). In addition, using PCR, the AnxA2 segment aa 49-75 was swapped with the corresponding AnxA1 segment aa 58-84 [AnxA2 (aa 49-75) > AnxA1 (aa 58-84)]. Purified PCR fragments were digested with the appropriate restriction enzymes and subcloned into the corresponding digested pIRES2-AnxA2-HA-EGFP vector. All final cDNA constructs were verified by DNA sequencing.

RNA Interference – To silence human AnxA2, a 29mer pRS-shRNA was used: (sh3, GCATCAGCACTGAAGTCAGCCT

TATCTGG) (Origene). The control pRS-shGFP vector [shCtl] contained a non-effective 29mer shGFP cassette.

Quantitative RT-PCR – Quantitative PCR (qPCR) analysis of RNA preparations was performed as previously described (13;28). Briefly, each cDNA sample was submitted to 2 polymerase chain reaction (PCR) amplifications: one for normalizing ribosomal-protein gene (S14 for human and S16 for mouse cDNAs) and the other for the gene of interest, each in triplicate. The Mx3500P system from Stratagene was used to perform and analyze the qPCR reactions, using S14 or S16 amplifications as normalizers (28).

Cell Culture and Transfections – HepG2, HuH7, COS-1, BSC40 and HEK293 cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), whereas CHO-K1 and CHO-K1 mutant Pgsd-677 cells that lack heparan sulfate proteoglycans (29) were grown in Ham's F12:DMEM (50:50) media with 10% FBS. Y1 mouse adrenal cells were grown in F12K medium with 15% horse serum and 2.5% FBS. All cells were maintained at 37°C under 5% CO₂. At 80-90% confluence, HuH7 and CHO-K1 cells were transiently transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen), HEK293 cells were transfected with Effectene (Qiagen) and HepG2 cells were transfected with Fugene HD (Roche). Twenty-four hours after transfection cells were washed and incubated in serum-free medium, containing or not exogenous conditioned media and/or purified proteins, as indicated in figure legends, for an additional 20h before media collection and cell lysis. For analysis of the various AnxA2 mutants in HEK293 cells, 24h post-transfection, the cells were washed and then incubated for another 24h in complete medium containing 50 µM of the proteasome inhibitor ALLN (Calbiochem). Stable transfectants of shRNA-AnxA2 were obtained in HuH7 cells following puromycin selection.

Antibodies and Purified Proteins – The rabbit polyclonal antibody against PCSK9 was raised in-house as described (14). Other antibodies used were a rabbit polyclonal V5-antibody (Sigma), an unconjugated or horseradish peroxidase (HRP)-conjugated mouse

monoclonal anti-V5 (mAb:V5 or mAb:V5-HRP, Invitrogen), goat anti-LDLR (human) (R&D Systems), HRP-conjugated mouse anti-His (Qiagen) and anti-HA (Roche Diagnostics), monoclonal anti-HA-Alexa Fluor 488 (Invitrogen) and mouse anti-AnxA2 (human) (BD Biosciences). Purified CHRD-His was produced in-house, purified PCSK9-(His)₆ was a kind gift from Bristol-Myers Squibb, purified AnxA2-(His)₆ and AnxA1-(His)₆ were purchased from EMD biosciences.

Cell Lysis and Subcellular Fractionation – Mouse tissues and cells were lysed in ice cold radioimmune precipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing a cocktail of protease inhibitors (Roche Diagnostics). For crude membrane preparations and subcellular fractionation COS-1 cells were homogenized in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 200 mM sucrose and a protease inhibitor cocktail. The homogenate was centrifuged at 720 x g for 10 min at 4°C to remove nuclei and cell debris. The resulting supernatant S1 was centrifuged at 15,000 x g for 10 min at 4°C. The pellet P1, containing organelles such as lysosomes and mitochondria, was solubilized in RIPA buffer and the supernatant S2 was centrifuged at 100,000 x g for 75 min at 4°C (SW40 rotor, Beckman ultracentrifuge). The resulting crude P2 cell membrane pellet was solubilized in RIPA and the soluble supernatant S3 was kept for Far Western blot analysis. Quantitation of protein concentration was effected by the Bradford protein assay. The supernatant S3 (3 µg protein) was analyzed by SDS-PAGE and compared to 30 µg protein loads from other subcellular fractions.

Far Western Blot Assays – Lysates (20 to 30 µg protein), media or purified AnxA2-(His)₆ were heated in reducing or non-reducing Laemmli sample buffer, resolved by SDS-PAGE on 8% glycine gels and electro-transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Following 1h incubation in 5% skim milk in Tris-Buffered Saline-0.1% Tween (TBST), membranes were incubated with conditioned media of CHO-K1 cells overexpressing either an empty vector (pIRES-V5), PC5A-V5, CHRD-V5, pIRES-D374Y,

PCSK9-V5 or its V5-tagged mutants, or incubated with purified AnxA2-(His)₆ for 3h at room temperature. Membranes were then washed in TBST and incubated with the HRP-conjugated anti-V5 or anti-His antibodies and revealed by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare). For competition experiments, 10 µg of His-tagged PCSK9 or CHR1D were added to the PCSK9-V5 media before Far Western blotting. For PCSK9 binding requirements with the 33 kDa protein, 1M NaCl, 10 mg/ml heparin, 1M NaCl + 10 mg/ml heparin, or 100 mM EDTA were added to the PCSK9-V5 conditioned media used for Far Western blotting.

Immunoprecipitation and Western blot assays – For immunoprecipitation cell lysates were incubated overnight at 4°C with anti-V5-agarose beads (Sigma) and washed 5 times with cold lysis buffer. Following addition of reducing Laemmli sample buffer bound proteins were revealed by Western blot or separated by SDS-PAGE (8%) and stained by Coomassie blue for band excision and mass spectrometry. As control for the immunoprecipitation, antigens complexed with the anti-V5-agarose beads were eluted with the V5 peptide (50 µM, Sigma), separated by SDS-PAGE (8%) and revealed by Western blotting with the anti-V5-HRP antibody.

Western blotting experiments were made on samples that were reduced in Laemmli buffer, heated and resolved on 8% glycine SDS-PAGE gels. Separated proteins were then electro-transferred onto nitrocellulose, and probed with HRP-conjugated anti-V5 or anti-HA tags or with primary antibodies. Bound primary antibodies were detected with corresponding species-specific HRP-labeled secondary antibodies and revealed by enhanced chemiluminescence. Quantitation of band intensity was done with the ImageJ software version 1.37 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland).

2D Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry - 2D gel electrophoresis was performed according to protocols from (30) and GE Healthcare (2D electrophoresis handbook, 2004). COS-1 cells were lysed in 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS (3-[(3-

Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate), 0.5% immobilized pH gradient (IPG) buffer (carrier ampholyte mixture) (GE Healthcare) and 0.002% bromophenol blue. Protein concentration was estimated by the Bradford assay and adjusted to 0.6 µg/ml with the lysis buffer. 40 mM dithiothreitol was then added and cell lysates were kept rotating at 4°C for 60 minutes. Samples (200 µl) were loaded onto broad-pH-range (pH 3-10) IPG gel strips (GE Healthcare) and the first-dimension isoelectric focusing separation was achieved using an Ettan IPGphor II system (GE Healthcare). For the second-dimension SDS-PAGE separation, IPG strips were equilibrated 15 min in the SDS equilibration buffer (6M urea, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29.3% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue) containing 10 mg/ml dithiothreitol and an additional 15 minutes in the SDS equilibration buffer containing 25 mg/ml iodoacetamide and applied to 12% SDS gels. Gels were then either stained in Coomassie blue or transferred on nitrocellulose and processed for Far Western blotting with PCSK9-V5. The signal obtained at ~33 kDa in the Far Western blot was used to establish the position of the band to be excised for mass spectrometry analysis.

For protein identification by LC/MS/MS, the bands or spots of interest were cut out from the gel and digested with trypsin (0.1 µg) for 60 min at 58°C. Peptides were extracted from the gel at room temperature, and the supernatants were transferred into a 96-well plate and then completely dried in a vacuum centrifuge. Before the analysis, peptides were dissolved under agitation for 15 min in 13 µl of formic acid 0.1%, then sonicated for 5 min, and centrifuged at 2,000 rpm for 1 min. Analysis of the peptide mixture was done by liquid chromatography–mass spectrometry (LC/MS/MS) using a LTQ Orbitrap mass spectrometer configured with an on-line NanoLC-2D HPLC system (Eksigent, Dublin, CA). Protein identification was obtained from the MS/MS spectra using Mascot analysis software (Matrix Science).

Hexa-His Pull-Down Assay – 20 µg of purified AnxA2-(His)₆ or AnxA1-(His)₆ or no proteins (for negative control) were immobilized onto a cobalt chelate resin (Thermo Scientific). The resin was then washed several times with 40 mM imidazole and

incubated overnight at 4°C with 800 µl of conditioned media from PCSK9-V5-transfected CHO-K1 cells containing 40 mM imidazole. The resin was then washed several times with imidazole (40 mM), heated in reducing Laemmli sample buffer and centrifuged. Supernatants were analyzed by Western blot as described above using the anti-V5-HRP or anti-His-HRP antibodies.

Immunocytochemistry – For immuno-cytochemistry, cells were plated on glass bottom culture dishes (MatTek) and then transfected the following day. Twenty-four hours post-transfection, the cells were washed with DMEM, incubated for an additional 20h without serum and then washed 3 times with PBS. Cell surface labelings were made under non-permeabilizing conditions by fixation with 3.7% formaldehyde for 10 min at room temperature. Cells were then washed in PBS, incubated for 5 min in 150 mM glycine, washed once in PBS and incubated for 30 min in 1% bovine serum albumin in PBS. Cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies and then washed 4x with PBS. Antigen-antibody complexes were revealed by incubation for 45 min at room temperature with corresponding species-specific Alexa fluor (488, 555 or 647)-tagged secondary antibodies (Invitrogen). After several washes in PBS, cells were covered with 5% 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (Sigma) in PBS/glycerol 90% and immunofluorescence analyses were performed with a Zeiss LSM-510 confocal microscope.

4.3. RESULTS

PCSK9 Binds to a ~33 kDa Protein – Figure 1A schematically summarizes the various constructs (14) used below. Nitrocellulose blots of various cell line extracts were incubated with the conditioned medium of CHO-K1 cells overexpressing PCSK9-V5 (Figs. 1A,B). Following washes, incubation with an anti-V5 mAb revealed a ~33 kDa protein interacting with native PCSK9-V5, especially in COS-1, BSC40 and HuH7 cell lysates (Fig. 1B, middle panels). As controls, we show that the conditioned media of CHO-K1 cells transfected with either an empty pIRES-V5-EGFP vector or another secreted

proprotein convertase PC5A-V5 (29) do not reveal any interacting protein (Fig. 1B, left panels). This suggests that the denatured ~33 kDa protein specifically binds native PCSK9. Subcellular fractionation of COS-1 cells revealed that although the ~33 kDa binding protein is associated with membranes (15,000 x g and 100,000 x g pellets), it is ~10x more abundant in the soluble 100,000 x g supernatant (Fig. 1B, middle-right panel, and legend). Using the same approach, mouse tissue extracts revealed that a similar ~33 kDa PCSK9 interactor is found mostly in the small intestine, including ileum and jejunum, but is less abundant in liver, adrenals and kidney (see large arrow in Fig. 1B, right panel). Note that in liver, the major interacting protein migrates with an apparent molecular mass of ~45 kDa (small arrow Fig. 1B, right panel).

To identify the PCSK9 interacting domain, we incubated COS-1 cell extracts with various PCSK9 constructs (Figs. 1A,C). The data showed that the interacting domain of PCSK9 is its C-terminal CHRD, since a construct lacking it (PCSK9-L455X-V5) does not bind to the ~33 kDa protein, while the CHRD alone binds at least 3-fold better than the full length PCSK9 (Fig. 1C, left panels), and effectively competes for this interaction with the full length protein (Fig. 1D). In agreement, constructs still containing the CHRD, such as those resulting in the furin cleaved PCSK9 form (aa 219-692), or the uncleavable R218S (26), the non-Tyr sulfated form (Y38F) (1), or the mutant D374Y that strongly binds the LDLR (21), still interact with the ~33 kDa protein (Fig. 1C). While 100 mM EDTA and 10 mg/ml heparin do not affect the PCSK9's ability to bind the ~33 kDa protein, incubation in the presence of 1M NaCl decreased the binding by ~70%, suggesting that charges are not the only determinants (Fig. 1E). Finally, we note that heparin actually enhances the binding and its presence largely prevents the effect of NaCl (Fig. 1E).

The ~33 kDa PCSK9 Partner is Annexin A2 – In order to identify the PCSK9 interactor, we overexpressed either an empty vector (pIRES-V5) or PCSK9-V5 in COS-1 cells. Cell extracts were then immunoprecipitated with anti V5-coupled agarose beads,

followed by SDS-PAGE separation and mass spectrometry analysis of the protein(s) migrating at ~33 kDa (Fig. 2A; boxed areas). The efficacy of the immunoprecipitation control is shown in Fig. 2B. The mass spectrometric data (not shown) revealed that the ~33 kDa protein is monkey Annexin A2 (AnxA2; XP_001155637), which exhibits 99% protein sequence identity to human AnxA2 (AAH09564). Furthermore, this interacting protein is found in the PCSK9-V5 overexpressing cells but not in control cells, suggesting that AnxA2 is the sought PCSK9 interactor.

In order to further substantiate the nature of the ~33 kDa interactor, we resolved 120 µg proteins obtained from 1x10⁶ COS-1 cells by 2D [SDS-PAGE]-[Isoelectric focusing]. Proteins separated by 2D gels were either stained with Coomassie blue (Fig. 2C) or transferred to nitrocellulose and processed for Far Western blotting with PCSK9-V5 (Fig. 2D). The signal obtained coinciding with a ~33 kDa/pI 7.5 protein in the far Western blot (Fig. 2D) was used to localize the exact position of the band to be excised for mass spectrometric analysis (Fig. 2C, boxed area) using tandem MS/MS. Protein database search using Mascot analysis (Matrix Science) revealed ~77% tryptic peptide coverage with a total Mascot score of 2540, corresponding to human AnxA2. The mass spectral data (Fig. 2E) clearly confirmed that AnxA2 is the major PCSK9-interactor identified following co-immunoprecipitation with PCSK9-V5 in COS-1 cell lysates (Fig. 2A).

Specificity of the Interaction of Native PCSK9 with AnxA2 – To confirm that the interaction seen in COS-1 cell extracts can be reproduced by overexpression of AnxA2 in cells that do not substantially express this protein, we overexpressed human AnxA2 or as control human AnxA1 in CHO cells. Far Western blot analysis confirmed that PCSK9 specifically binds AnxA2, but not the closely related (~53% protein sequence identity) family member AnxA1 (Fig. 3A). This is further confirmed by pull-down assays whereupon immobilized native AnxA2-(His)₆ bound PCSK9 and its furin cleaved form (PCSK9-Δ218) (26), while AnxA1-(His)₆ does not (Fig. 3B).

Co-immunoprecipitation of PCSK9-V5 and HA-tagged AnxA2 (AnxA2-HA), but not AnxA1, was demonstrated following their co-expression in CHO-K1 cells (Fig. 3C). Interestingly, the cellular partner of AnxA2, known as p11 (31), did not interfere with the PCSK9-AnxA2 co-immunoprecipitation (Fig. 3C), suggesting that PCSK9 could bind the physiologically observed tetrameric cell surface complex of (p11)₂-(AnxA2)₂ (31). Native PCSK9 binds in a dose-dependant manner purified AnxA2 and its dimer (Fig. 3D, right panel) under both reducing and non-reducing conditions (Fig. 3D, left panel), suggesting that no critical disulfide bond(s) in AnxA2 is needed for this interaction. This data agrees with the interaction observed in the 2D-Far Western analysis performed following iodoacetamide treatment of cell extracts (Fig. 2D). Finally, AnxA2 binds only native PCSK9 or its CHRDR, but not their SDS-PAGE denatured forms (Fig. 3E). Thus, the structural integrity of PCSK9 and its CHRDR is important for the interaction, while that of AnxA2 is not. This suggests that PCSK9 binds to a linear aa stretch of AnxA2.

The CHRDR mutation Q554E in PCSK9 leads to lower levels of LDL cholesterol (25) indicating a loss-of-function of PCSK9 towards LDLR degradation. Since the CHRDR binds AnxA2, we hypothesized that the Q554E mutant would bind more strongly to AnxA2 thereby interfering with the LDLR binding. Indeed, Far Western blots of extracts from COS-1, CHO-K1 or AnxA2-transfected CHO-K1 cells with PCSK9-V5 or its mutant Q554E-V5 (Fig. 4A) demonstrated that the latter's binding to AnxA2 was ~3 fold higher than that of wild type PCSK9 (Fig. 4B).

AnxA2 is known to be a cytosolic and a membrane-associated protein through phospholipid binding. It is also known to translocate to the cell surface and to associate with diverse extracellular proteins (32;33). To determine if the interaction of PCSK9 with AnxA2 occurs at the external layer of the cell surface, PCSK9-V5 and AnxA2-HA transfected CHO-K1 cells were fixed under non-permeabilizing conditions and labeled with the anti-V5 and anti-HA tag antibodies. Immunofluorescence staining demonstrated a

partial co-localization of PCSK9 with AnxA2 at the plasma membrane of CHO-K1 cells (Fig. 5), supporting their co-immunoprecipitation and interaction in a cellular context.

AnxA2 Inhibits the PCSK9-Enhanced LDLR Degradation – The effect of the PCSK9-AnxA2 interaction on the LDLR-lowering function of PCSK9 (11;34) was first tested by overexpressing PCSK9, with or without AnxA2, in CHO-K1 cells. While the LDLR level was reduced by ~30% in PCSK9-transfected cells, its level returned to that of the control pIRES-transfected cells when PCSK9 was co-transfected with AnxA2 (Fig. 6A). Furthermore, the transfection of HepG2 cells (endogenously expressing PCSK9, but not AnxA2) with AnxA2 alone increased the LDLR level by ~40% and by to ~90% when AnxA2 was co-transfected with its accessory protein p11 (Fig. 6B).

To determine if the PCSK9-AnxA2 interaction can inhibit the PCSK9-induced LDLR degradation from the extracellular milieu, HepG2 cells were incubated for 20h with conditioned media from PCSK9-transfected CHO-K1 cells with or without the exogenous addition of 5 ug/ml of purified AnxA2-(His)₆. Western blot of HepG2 cell lysates showed that the addition of exogenous AnxA2 reduced the ability of PCSK9 to enhance LDLR degradation (from ~30% to ~10%; Fig. 6C). Note that the addition of exogenous AnxA2 to non-transfected cells also increased the level of LDLR, likely due to its effect on endogenous PCSK9 in HepG2 cells.

Finally, addition of 1 µg of purified PCSK9 to CHO-K1 cells overexpressing the LDLR at 4°C (preventing internalization) resulted in a visible cell surface localization of PCSK9 (Fig. 6D), and the latter was reduced by further addition of either 5 or even more so 20 µg purified AnxA2 (Figs. 6E,F). Therefore, we deduce that because of its interaction with the CHR domain of AnxA2 reduces the level of cell surface PCSK9 likely bound to the LDLR.

The effect of the PCSK9-AnxA2 interaction on the LDLR-lowering function of PCSK9 was also analyzed by immunofluorescence under non-permeabilizing conditions, to overcome problems associated with the low transfection efficiency of HepG2 cells and

subsequent detection of small changes in total protein levels by Western blot. Expression of AnxA2 alone or together with p11 led to a strong increase in labeling intensity of cell surface LDLR (Figs. 7B,C) compared to control pIRES-transfected cells (Fig. 7A). Overexpression of PCSK9 in HepG2 cells appreciably reduces the levels of cell surface LDLR, as compared to control (Figs. 7A,D). Finally, expression of AnxA2 with either WT-PCSK9 or the gain of function mutant PCSK9-D374Y (Fig. 7F, inset) prevented their LDLR-lowering effect (Figs. 7D-F).

shRNA Knockdown of AnxA2 Enhances LDLR Degradation in HuH7 Cells – Stable (Fig. 8A) or transient (Fig. 8B) transfection of HuH7 cells with either an AnxA2-shRNA or a control one resulted in a ~60-70% knockdown of AnxA2, as compared to control, and a reduction of ~40-70% of the LDLR levels (Figs. 8A,B). These data support the notion that in HuH7 cells endogenous AnxA2 can inhibit the PCSK9-enhanced degradation of the LDLR. HEK293 cells [expressing negligible amounts of PCSK9 mRNA, as compared to either HepG2 or HuH7 cells (Fig. S1)] were transfected with AnxA2 or AnxA1 cDNAs with or without p11 (Fig. 8C) or with shRNAs (Fig. 8D). None of these treatments affected the levels of endogenous LDLR in HEK293 cells. This result substantiates the specific relation between AnxA2 and PCSK9 in LDLR regulation.

Finally, transient transfection of HuH7 cells with the AnxA2-shRNA revealed that cells still expressing high levels of AnxA2 also show elevated immunoreactivity to LDLR, whereas the reverse is true in cells lacking AnxA2 (Fig. 8E, dotted line), likely due to shRNA downregulation of AnxA2. This representative result was observed over many clusters of cells (not shown).

Identification of the R1 Repeat Domain of AnxA2 as the PCSK9-Interacting Sequence – To identify the specific sequence(s) of AnxA2 that mediates the interaction with PCSK9, we deleted/mutagenized several segments of AnxA2 and overexpressed these constructs (Fig. 8A) in HEK293 cells. Far Western blots of these cell lysates using PCSK9-V5 revealed that deletion of the N-terminal segment aa 2-24 of AnxA2 [which is known to

be necessary for binding to p11 and tissue plasminogen activator and to have other functions such as membrane bridging (31;35)], does not affect binding to PCSK9 (Fig. 9B). However, deletion of the first Annexin-like repeat R1 of AnxA2 completely abrogated the interaction with PCSK9-V5 (Figs. 9A,B) or CHR1D-V5 (not shown), while deletions of the three other repeats (R2, R3, or R4) had no major effect (Figs. 9A,B). Thus, the R1 repeat seems to be the major domain of AnxA2 implicated in PCSK9 binding. Comparison of the primary sequences of the R1 domain of AnxA2 and AnxA1 [which does not bind PCSK9; Fig. 3], indicated areas of divergent sequences (Fig. 9D). In initial screens, replacement of the AnxA2 second loop sequence ⁸⁰KKELA⁸⁴ with the corresponding AnxA1 loop sequence ⁸⁰GKPLD⁸⁴ had no appreciable effect on PCSK9 binding (Fig. 9C). However, when the ⁷⁷RRTKK⁸¹ sequence was mutated to ⁷⁷AATAK⁸¹ or ⁷⁷AATAA⁸¹, Far Western blots using PCSK9-V5 showed that the integrity of the positively charged sequence ⁷⁷RRTKK⁸¹ is critical for the AnxA2-PCSK9 binding (Fig. 9C). Replacing the ⁷⁷RRTKKELASALK⁸⁸ sequence by ⁷⁷AATAAELASALA⁸⁸ also abolished binding of AnxA2 to PCSK9 (Fig. 9C). Since the mutation of Lys⁸⁰ by Gly⁸⁰ did not affect binding, this may mean that the critical motif is ⁷⁷RRxxK⁸¹. Finally, replacement of the relatively conserved segment 49-75 (Figs. 9C,D) of AnxA2 by the corresponding one of AnxA1 (aa 58-84) also abolished binding to PCSK9 (Fig. 9C). Thus, the interaction of PCSK9 with the R1 domain of AnxA2 may be complex, requiring more than one structural characteristic for optimal binding.

4.4. DISCUSSION

The mechanism of LDLR trafficking, endocytosis and recycling has been widely studied and recently reviewed (36-38). However, since the discovery of PCSK9 (1), the mechanism of LDLR degradation (3;4;23;34) is being increasingly revised. The present prevailing hypothesis is that the in trans interaction of the catalytically inactive prosegment-PCSK9 complex with the EGFA domain of the LDLR impedes the recycling of this receptor, thereby promoting its degradation by endosomal/lysosomal hydrolases (23;38).

As shown by crystallization, the PCSK9-EGFA complex, the interaction involves the catalytic subunit of PCSK9 and the critical Ser153 (23), which becomes the N-terminus of PCSK9 upon autocatalytic cleavage of proPCSK9 at the VFAQ₁₅₂↓S₁₅₃IP sequence (3;39). However, natural mutations in the prosegment or the CHRD of PCSK9 also result in modifications of the plasma cholesterol profiles in humans (11;24;25), indicating the presence of other determinants within these domains that can modulate circulating LDL-cholesterol levels.

Annexins are part of a family of Ca²⁺-dependent, anionic phospholipid-binding proteins, which in vertebrates is composed of 12 members (40). Annexins contain a highly conserved protein core composed of four repeats harboring calcium-binding sites necessary for their membrane association capability. The N-terminus of AnxA2 (aa 1-24) mediates heterotetramer formation with the S100 protein p11 (S100A10) that enhances membrane phospholipid binding affinity resulting in the association of the protein complex with the plasma membrane (41). AnxA2 lacks a signal peptide but has nevertheless been identified on the extracellular surface of various cell types. The mechanism regulating this translocation is not known but is dependent on both expression of p11 and tyrosine phosphorylation of AnxA2, and might involve localization to caveolae (42-44). The presence of AnxA2 on the extracellular face of the plasma membrane has been demonstrated in endothelia (45), skin keratinocytes (46), epithelial cells (47;48) and many tumor cells (49). Extracellular AnxA2 has been described as a membrane-associated receptor for a number of different proteins. Its interaction with tissue-type plasminogen activator (tPA) on endothelial cell surfaces is critical (33), as demonstrated by AnxA2 knockout mice, which are deficient in plasminogen processing into plasmin and neo-angiogenesis (50).

The data presented in this work revealed that the activity of PCSK9 on LDLR can be inhibited by AnxA2 via its binding to CHRD. The CHRD and the prosegment provide structural integrity to the whole PCSK9 molecule allowing it to interact with the LDLR

through its catalytic domain (21;23). Thus, we surmise that binding of AnxA2 to the CHRDL must somehow cause allosteric structural changes in the catalytic subunit of PCSK9, hampering its ability to enhance the degradation of the LDLR. Our data revealed that at 4°C AnxA2 reduces the level of cell surface PCSK9 (Figs. 6D-F), suggesting a reduced ability to bind LDLR. In agreement, overexpression of AnxA2 increases the cell surface expression of the LDLR in HepG2 cells (Fig. 7B). Whether the PCSK9-AnxA2 complex is internalized in endosomes/lysosomes and/or the CHRDL-AnxA2 interaction prevents the internalization of the PCSK9-LDLR complex are not known. Furthermore, it is yet to be determined if PCSK9 remains associated with its prosegment upon binding to AnxA2, as it does when it binds the LDLR (23).

Analysis of the mRNA expression of AnxA2 in human cells lines by qPCR revealed that it is highly expressed in most cells, with endothelial cells (e.g., HUVEC) being one of the richest source (Fig. S1). While PCSK9 mRNA levels in HuH7 cells are similar to those in HepG2 cells, those of AnxA2 are ~2-fold higher in HuH7 cells. However, AnxA2 protein is much more expressed in HuH7 cells (not shown), in agreement with the Far Western data (Fig. 1B, middle panel). A similar analysis performed on mouse tissues revealed that PCSK9 is richest in liver, colon, ileum, duodenum and kidney (13). Although not forming a perfect mirror image, AnxA2 mRNA levels peak in jejunum, the region of the small intestine that exhibits the lowest PCSK9 levels, and reach very low levels in liver, the richest source of PCSK9 (Fig. S2). This agrees with the weak interaction of PCSK9 with a ~33 kDa AnxA2-like protein in liver extracts (Fig. 1B; right panel). AnxA2 is very abundant at the surface of endothelial cells, including those of lungs, small intestine and adrenals. This may explain the inability of high concentrations of injected/infused PCSK9 to degrade the LDLR in adrenals (51), as well as the rapid turnover of PCSK9, which is only in part dependent on the presence of the LDLR (51). On the other hand, exogenous PCSK9 is efficient in lowering the LDLR levels in liver. However, this does not exclude the possibility that other liver proteins may interact with PCSK9, as evidenced by the ~45 kDa protein detected by Far Western (Fig. 1B; right panel). The inability of PCSK9 to

degrade the LDLR in fibroblasts and COS-7 cells (22) may also be due to their high expression of AnxA2 (52).

Our study is the first report on the presence of an endogenous inhibitor of PCSK9. We demonstrated the association of the CHRDL of PCSK9 with AnxA2 providing evidence for a new regulatory pathway that inhibits the PCSK9-enhanced LDLR degradation. To our knowledge, the specific binding of a protein to the AnxA2 R1 domain has not been reported before. Furthermore, the identification of the R1 domain of AnxA2 that mediates binding to PCSK9 provides a potential new peptide-derived tool to regulate PCSK9 function. Derivatives or mimics of this segment could be used to inhibit PCSK9 function on LDLR and possibly on other targets, such as VLDLR or ApoER2 (19). The peptide could also be used to derive a co-crystal structure in order to better define the CHRDL residues, including Gln554, seemingly implicated in this interaction (Fig. 4B). The CHRDL is composed of 6 β -strand structures repeated 3-times and hence forming 3-subdomain modules M1, M2 and M3 (21). The Gln554 residue is in an exposed loop within the CHRDL and is unique to the second subdomain module M2 (21). It has been suggested that the CHRDL forms a possible receptor-like structure that shares similarity to the homotrimeric hormone resistin (24), which regulates insulin secretion. However, resistin did not interact with AnxA2 as assessed by Far Western, nor did it compete with PCSK9 for binding to AnxA2 (not shown). The interaction of the R1 domain of AnxA2 with the predicted groove-like structure of the CHRDL (24) or a neighboring site(s) need further investigations.

The impact of AnxA2 on LDL-cholesterol metabolism remains to be assessed *in vivo*. Future studies using AnxA2 knockout mice (50) would be valuable in this respect. In conclusion, our study provided evidence for a new way to fine tune the activity of PCSK9 on the LDLR, via AnxA2 interaction. This opens the way to the identification of other PCSK9 binding proteins that may further regulate its function in a temporal and/or tissue-specific manner. These may provide new therapeutic strategies to regulate the level of

circulating LDL-cholesterol and hence slow down the development of coronary heart disease.

FOOTNOTES

*This research was supported by grants from the CIHR # MOP-36496, # CTP-82946 and a Canada Chair # 201652. GM was supported by a post-doctoral NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada) fellowship and SP was supported by a doctoral CIHR fellowship.

We are grateful to Josée Hamelin, Marie-Claude Asselin, Ann Chamberland and Ursula Pilat for excellent technical assistance. We are also thankful to Annik Prat for critically reading the manuscript, Volker Gerke for the p11-YFP plasmid, Daniel Figeys and Denis Faubert for MS/MS analysis, Michael Ponamarev for the CHRD preparation, and Rex Parker and Franck Duclos for providing purified PCSK9. Many thanks to all members of the Seidah laboratory for helpful discussions and to Brigitte Mary for administrative assistance.

The abréviations used are : aa, amino acid; Ab, antibody; AnxA2; annexin A2; AnxA1, annexin A1; CHRD, cysteine-histidine-rich domain; PC, proprotein convertase; qPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; PCSK9, proprotein convertase subtilisin kexin-like 9; LDLR, low density lipoprotein receptor; EGFA, epidermal growth factor-like domain A; tPA; tissue-type plasminogen activator; FWB, Far Western blot

4.5. FIGURE LEGENDS

FIG.1. PCSK9 binds to a ~33 kDa protein. (A) Schematic diagram of the full-length (FL) PCSK9-V5, PCSK9 without its CHR1 (L455X-V5) or the CHR1-V5 constructs used for Far Western blotting. (B-E) Far Western blot (FWB) assays of cell and tissue lysates using conditioned media of CHO cells overexpressing pIRES-V5, PCSK9-V5, PCSK9-V5 or mutants thereof. All of these were detected by the HRP-tagged V5 mAb. (B) The COS-1 cells soluble fraction (supernatant S3; 3 µg protein) was analyzed by Far Western blot and compared to 30 µg protein loads from other subcellular fractions. (C) Note that the D374Y is not V5-tagged and was revealed using a PCSK9 polyclonal antibody (14). (D) For competition experiments, purified PCSK9-His or CHR1-His were added to the PCSK9-V5 conditioned media used for Far Western blotting. (E) PCSK9-V5-binding requirements were tested by adding 1M NaCl, 10 mg/ml heparin, 1M NaCl + 10 mg/ml heparin, or 100 mM EDTA to the PCSK9-V5 conditioned media used for Far Western blotting. Heavy arrows point to the migration position of the ~33 kDa protein, and the light arrow to that of the ~45 kDa protein. (-) denotes a control lane where nothing was added to the Far Western blotting media.

FIG.2. PCSK9 co-immunoprecipitates with endogenous Annexin A2. (A) Lysates of pIRES-V5- or PCSK9-V5- transfected COS-1 cells were immunoprecipitated with anti-V5-agarose beads. The antigen-antibody complexes were separated by SDS-PAGE (8%) and Coomassie blue stained. For both pIRES-V5 and PCSK9-V5 conditions, the bands at ~33 kDa were excised (boxed areas) and proteins analyzed by mass spectrometry. (B) As a control for the immunoprecipitation, antigens complexed with the anti-V5-agarose beads were eluted with the V5 peptide, separated by SDS-PAGE and revealed by Western blotting with the anti-V5 antibody. (C-E) Identification of the PCSK9 binding partner in COS-1 cells by 2D Far Western blot, 2D SDS-PAGE and mass spectrometry. (C-D) COS-1 cell lysates were separated by a first horizontal dimension using a wide pH range isoelectrofocussing gel strip (pH 3-10) and then vertically by SDS-PAGE (12%). After

SDS-PAGE, proteins were either Coomassie blue stained (C) or electrotransferred onto a nitrocellulose membrane and probed by Far Western with PCSK9-V5 (D). Spots (C, boxed area) were aligned with those of the Far Western blot (D) using Photoshop software, excised and the proteins analyzed by mass spectrometry after trypsin digestion. (E) Results of the mass spectrometry Mascot analysis identifying the presence of AnxA2 with 77% peptide coverage (bold sequences).

FIG.3. Characterization of the interaction of PCSK9 with AnxA2. (A) PCSK9-V5 Far Western blot of lysates of COS-1 cells, wild type (WT) CHO-K1 cells, CHO-K1 cells overexpressing an empty vector (pIRES), AnxA1 or AnxA2. (B) Poly-histidine pull-down assay. Purified native AnxA2-(His)₆ or AnxA1-(His)₆ were immobilized on cobalt chelate beads and incubated with PCSK9-V5. Bound proteins were released from beads in Laemmli sample buffer and analyzed by Western blotting with the anti-V5-HRP or anti-His-HRP antibodies and revealed by ECL. PCSK9 (heavy arrow) and its furin-cleaved form (PCSK9-Δ218; light arrow) were pulled-down by AnxA2. (C) Co-immunoprecipitation experiments of CHO-K1 cells co-transfected with PCSK9-V5 and either AnxA1-HA, AnxA2-HA or with AnxA2-HA and p11. Proteins immunoprecipitated with the anti-V5 mAb were revealed by Western blotting with anti-HA-HRP or anti-V5-HRP antibodies. Expression of the transfected constructs was analyzed by Western blotting of cell lysates using the anti-V5-HRP or anti-HA-HRP antibodies. (D, left panel) PCSK9-V5 Far Western blots of purified AnxA2-(His)₆ in the absence or presence of reducing agents. Note that in non-reducing conditions, PCSK9-V5 binds both the dimer and monomer forms of AnxA2. (D, right panel) Western blots of the purified AnxA2-(His)₆ using the anti-AnxA2 mAb in non-reducing or reducing conditions. (E, upper panel) Media from CHO-K1 cells expressing PCSK9-V5 or the CHRD-V5 were separated by SDS-PAGE (8%), transferred onto nitrocellulose, incubated with purified AnxA2-(His)₆ and probed with the anti-His-HRP antibody. (E, lower panel) The presence of overexpressed PCSK9 and CHRD in CHO-K1 cell media was verified by Western blotting using anti-V5-HRP.

FIG.4. The PCSK9 natural loss of function mutant Q554E strongly binds AnxA2. (A) Western blot analysis of conditioned media from CHO-K1 cells overexpressing PCSK9-V5 or its natural mutant Q554E-V5 used for Far Western blotting. (B) Far Western blots of extracts from COS-1, CHO-K1 or AnxA2-transfected CHO-K1 cells with the PCSK9-V5 or Q554E-V5 conditioned media of CHO-K1 cells analyzed in (A). The relative intensity of the binding of PCSK9-V5 (taken as 1x) or of the Q554E-V5 mutant (3x higher) to AnxA2 was calculated and normalized with respect to β -actin.

FIG.5. PCSK9 and AnxA2 co-localize at the cell surface. CHO-K1 cells co-transfected with AnxA2-HA and PCSK9-V5 were fixed under non-permeabilizing conditions. Cell surface immunofluorescence was performed using the anti-HA mAb (green labeling) and anti-V5 polyclonal Ab (red labeling). Nuclei of transfected cells are marked by the EGFP fluorescence (pseudo-colored blue). Arrows indicate areas of co-localization. These data are representative of at least 20 independent cell clusters. Bar= 10 μ m.

FIG.6. AnxA2 inhibits the PCSK9-enhanced LDLR degradation. (A) Lysates of CHO-K1 cells transfected with an empty vector (pIRES), or co-transfected with either PCSK9 and pIRES or PCSK9 and AnxA2, were analyzed by Western blot using the anti-LDLR and anti- β -actin antibodies. The relative intensity calculated for LDLR was normalized over the β -actin signal. (B) Lysates of HepG2 cells transfected with pIRES or co-transfected with either AnxA2 and pIRES or with AnxA2 and p11 were analyzed by Western blot using anti-LDLR and anti-actin antibodies. (C) LDLR and β -actin Western blots of lysates of HepG2 cells incubated with conditioned media from untransfected (control, Ctl) or PCSK9-transfected CHO-K1 cells with or without exogenous addition of 5 μ g/ml of purified AnxA2-His. (D-F) CHO-K1 cells overexpressing the LDLR were incubated at 4°C for 1h with 1 μ g of purified PCSK9-(His)₆ alone (D), or with the addition of 5 μ g (E) or 20 μ g (F) of purified AnxA2-(His)₆. Cells were then fixed under non-permeabilizing conditions and cell surface PCSK9 was visualized by immunofluorescence using the anti-PCSK9 antibody. These data are representative of at least 15 independent cell clusters. Bars= 10 μ m.

FIG.7. The level of LDLR increases at the surface of AnxA2-transfected cells. HepG2 cells transfected with (A) pIRES, (B) AnxA2, (C) AnxA2 and p11-YFP, (D) PCSK9, (E) PCSK9 and AnxA2 or (F) with the PCSK9 gain-of-function mutant D374Y and AnxA2 or the D374Y alone (F, inset) were fixed under non-permeabilizing conditions. Cell surface immunofluorescence was performed using the anti-LDLR (green labeling). Nuclei of transfected cells are marked by the EGFP fluorescence (pseudo-colored blue). Arrows point to the LDLR labeling at the surface of transfected cells. (C) p11-YFP and LDLR labelings were pseudo-colored blue and green, respectively. These data are representative of more than 40 independent cell clusters. Bars= 10 μ m.

FIG.8. shRNA knockdown of AnxA2 enhances LDLR degradation. (A) HuH7 cells were stably transfected with a control shRNA (Ctl) or with a specific shRNA against AnxA2 and analyzed for their LDLR, AnxA2 and β -actin content by Western blot. (B) HuH7 cells were transiently transfected with the control or the AnxA2 shRNA. Levels of AnxA2 knockdown and those of LDLR were revealed by Western blot and calculated relative to β -actin. (C) Lysates of HEK293 cells transfected with AnxA2, AnxA2-HA, AnxA1, AnxA1-HA, p11, or co-transfected with AnxA2 and p11 or with AnxA2-HA and the AnxA2 shRNA (D) were analyzed by Western blotting using the anti-LDLR, anti-AnxA2 or anti- β -actin. (E) HuH7 cells transiently transfected with the AnxA2 shRNA were fixed under non-permeabilizing conditions and labeled for AnxA2 (red) and LDLR (green). Cells showing low levels of AnxA2 labeling were localized and analyzed for their LDLR content at the plasma membrane. Dotted lines indicate the presence of a cell (inset) with low AnxA2 and LDLR surface labeling. These data are representative of at least 4 independent cell clusters.

FIG.9. Identification of the R1 repeat domain of AnxA2 as the PCSK9-interacting sequence. (A) Schematic representation of human AnxA2 domains (aa 1-24; R1: aa 37-102; R2: aa 109-174; R3: 193-259; R4: aa 269-334). Deletion mutations for all repeats include the C-terminal linker sequences (Δ R1: aa 37-108; Δ R2: aa 109-192; Δ R3: 193-268; Δ R4: aa 269-339). (B-C) HEK293 cells were transfected with full-length human AnxA2, its N-

terminal deletant Δ 2-24, or with HA-tagged full-length human AnxA2 and HA-tagged deletants (Δ R1, Δ R2, Δ R3, Δ R4), point mutants of the R1 repeat: ⁸⁰GKPLD, ⁷⁷AATAK, ⁷⁷AATAA, ⁷⁷AATAAELASALA or with an AnxA2 construct in which aa 49-75 were replaced by the corresponding AnxA1 aa 58-84. Following SDS-PAGE (10%) Far Western blotting (FWB) was performed on nitrocellulose membranes using conditioned media obtained from CHO-K1 cells overexpressing PCSK9-V5. Expression of the constructs was verified by Western blot (WB) using anti-AnxA2 or anti-HA-HRP antibodies. (D) Comparison of the amino acid sequences of the R1 repeats of AnxA2 (binding to PCSK9) and AnxA1 (not binding to PCSK9). Critical AnxA2 aa sequences for PCSK9-binding are represented by the arrow (aa 49-75) as well as the ⁷⁷RRTKK sequence.

FIG.S1. Relative mRNA expression of AnxA2 in human cell lines. Quantitative polymerase chain reactions were performed on RNA isolated from human cell lines using specific oligonucleotides for human AnxA2, PCSK9 and normalized to 10⁶ S14 mRNA levels, as described in Experimental Procedures. HUVEC, umbilical vein endothelial cells; A549, lung carcinoma; Hela, cervix adenocarcinoma; HT-29, colon adenocarcinoma; U87, epithelial-like glioblastoma-astrocytoma; HuH7, hepatoma; Caco2, colorectal adenocarcinoma; Lovo-C5, colon adenocarcinoma; A431, epithelial carcinoma; BON-1, endocrine pancreatic tumor; HepG2, hepatocellular liver carcinoma; Ben, epidermoid bronchial carcinoma; HT-1080, human fibrosarcoma; MCF7, epithelial breast cancer; SW13, adrenal carcinoma; HEK293, embryonic kidney cells; SKNM, neuroepithelioma; JurkatF, T cell lymphoblast-like; H295R, adrenocortical carcinoma.

FIG.S2. Relative mRNA expression of AnxA2 in mouse tissues. Quantitative polymerase chain reactions were performed on RNA isolated from mouse tissues using specific oligonucleotides for mouse AnxA2, PCSK9 and normalized to 10⁶ S16 mRNA levels, as in Figure. S1.

TABLE S1. Oligonucleotides used for site-directed mutagenesis of AnxA2 and its mutants.

Mutants	Sense (S)	Antisense (AS)
Δ 2-24	5'-CGCTAGCCACCACATGGGGTCTGTCAAAGCCTATAC-3'	5'-GAGCAGGTGTCTTCAATAGG-3'
Δ 37-108 (R1)	5'-GATGCTGAGTATGACGCTTCTGAGCTAAAAG-3'	5'GAAGCGCTACTACTCAGCATCAAAGTTAGTAGTAGGC-3'
Δ 109-192 (R2)	5'-CCTGCTCAGCAAGATGCTCGGGATCTC-3'	5'-CGAGCATCTTCTGAGCAGGTTCTTCAATAG-3'
Δ 193-288 (R3)	5'-GATTATGAACTGATTGACTATTTTGGCTGATCGGCTGTATG-3'	5'-GCAAAATAGTCAATCAGTTTCAATAATCAATGACAG-3'
Δ 289-339 (R4)	5'-GCCCTGACCGGTTACCCATACGATG-3'	5'-GTATGGGTAACCGGTCAGGGGCTTGTCTGAAATG-3'
⁸¹ KELA > GKELD	5'-GGAAAGCCACTTGATTCAGCACTGAAGTCAGCC-3'	5'-GCTGAATCAAGTGGCTTCCGGTCTCTCTGGTAGGC-3'
⁷¹ RRTKK > AATAK	5'-GCAGCGACCGCAAAGAACTTGCAATCAGCACTG-3'	5'-CTTTGGGTCGCTGCCTGGTAGGGGAAGGCAATATC-3'
⁷¹ RRTKK > AATAA	5'-CGACCGCAGCGGAACCTTGCATC-3'	5'-GATGCAAGTCCGGCTGGCGGTCG-3'
⁷¹ RRTKKELASALK	5'-CATCAGCACTGGCGTCAAGCCTTATC-3'	5'-GATAAGGCTGACGCCAGTGGCTGATG-3'
⁷¹ AATAELASALA	(1) (2)	(1) (2)
AnxA2 (aa 49-75)	5'-GCCACCATTTATCGACATTTTGACCAAAACGAGCAATGCACACAGAG-3'	5'-TTTGGTCAAAATGTCGATAAATGGTGGCCTCATCCACACCTTTGGTCTTG-3'
AnxA1 (aa 58-84)	5'-ACAATGCACAGACAGCAAAATTAAGCCGCCCTACCAGAGAAGGACCAAAAAGGAACCTTG-3'	5'-CTGGTAGGGGCTTAAATTTGGTGTCTCTGTGCAATTGTTGGTTTTGGTCAAAATGTCG-3'

4.6. REFERENCES

1. Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., and Chretien, M. (2003) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 928-933
2. Seidah, N. G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nassoury, N., Poirier, S., Essalmani, R., and Prat, A. (2008) *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 40, 1111-1125
3. Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M. C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D., Trillard, M., Abifadel, M., Tebon, A., Attie, A. D., Rader, D. J., Boileau, C., Brissette, L., Chretien, M., Prat, A., and Seidah, N. G. (2004) *J.Biol.Chem.* 279, 48865-48875
4. Maxwell, K. N. and Breslow, J. L. (2004) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 7100-7105
5. Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H., Jr., and Hobbs, H. H. (2006) *N.Engl.J Med.* 354, 1264-1272
6. Rader, D. J. and Daugherty, A. (2008) *Nature* 451, 904-913
7. Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derre, A., Villeger, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J. M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N. G., and Boileau, C. (2003) *Nat.Genet.* 34, 154-156
8. Kathiresan, S., Melander, O., Guiducci, C., Surti, A., Burt, N. P., Rieder, M. J., Cooper, G. M., Roos, C., Voight, B. F., Havulinna, A. S., Wahlstrand, B., Hedner, T., Corella, D., Tai, E. S., Ordovas, J. M., Berglund, G., Vartiainen, E., Jousilahti, P., Hedblad,

- B., Taskinen, M. R., Newton-Cheh, C., Salomaa, V., Peltonen, L., Groop, L., Altshuler, D. M., and Orho-Melander, M. (2008) *Nat.Genet.* 40, 189-197
9. Willer, C. J., Sanna, S., Jackson, A. U., Scuteri, A., Bonnycastle, L. L., Clarke, R., Heath, S. C., Timpson, N. J., Najjar, S. S., Stringham, H. M., Strait, J., Duren, W. L., Maschio, A., Busonero, F., Mulas, A., Albai, G., Swift, A. J., Morken, M. A., Narisu, N., Bennett, D., Parish, S., Shen, H., Galan, P., Meneton, P., Hercberg, S., Zelenika, D., Chen, W. M., Li, Y., Scott, L. J., Scheet, P. A., Sundvall, J., Watanabe, R. M., Nagaraja, R., Ebrahim, S., Lawlor, D. A., Ben Shlomo, Y., Davey-Smith, G., Shuldiner, A. R., Collins, R., Bergman, R. N., Uda, M., Tuomilehto, J., Cao, A., Collins, F. S., Lakatta, E., Lathrop, G. M., Boehnke, M., Schlessinger, D., Mohlke, K. L., and Abecasis, G. R. (2008) *Nat.Genet.* 40, 161-169
10. Schadt, E. E., Molony, C., Chudin, E., Hao, K., Yang, X., Lum, P. Y., Kasarskis, A., Zhang, B., Wang, S., Suver, C., Zhu, J., Millstein, J., Sieberts, S., Lamb, J., Guhathakurta, D., Derry, J., Storey, J. D., Avila-Campillo, I., Kruger, M. J., Johnson, J. M., Rohl, C. A., van Nas, A., Mehrabian, M., Drake, T. A., Lusic, A. J., Smith, R. C., Guengerich, F. P., Strom, S. C., Schuetz, E., Rushmore, T. H., and Ulrich, R. (2008) *PLoS.Biol.* 6, e107
11. Seidah, N. G. and Prat, A. (2007) *J.Mol.Med.* 85, 685-696
12. Rashid, S., Curtis, D. E., Garuti, R., Anderson, N. N., Bashmakov, Y., Ho, Y. K., Hammer, R. E., Moon, Y. A., and Horton, J. D. (2005) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 5374-5379
13. Zaid, A., Roubtsova, A., Essalmani, R., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Hamelin, J., Tremblay, M., Jacques, H., Jin, W., Davignon, J., Seidah, N. G., and Prat, A. (2008) *Hepatology* 48, 646-654

14. Nassoury, N., Blasiolo, D. A., Tebon, O. A., Benjannet, S., Hamelin, J., Poupon, V., McPherson, P. S., Attie, A. D., Prat, A., and Seidah, N. G. (2007) *Traffic*. 8, 718-732
15. Cameron, J., Holla, O. L., Ranheim, T., Kulseth, M. A., Berge, K. E., and Leren, T. P. (2006) *Hum.Mol.Genet.* 15, 1551-1558
16. Park, S. W., Moon, Y. A., and Horton, J. D. (2004) *J.Biol.Chem.* 279, 50630-50638
17. Maxwell, K. N., Fisher, E. A., and Breslow, J. L. (2005) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 2069-2074
18. McNutt, M. C., Lagace, T. A., and Horton, J. D. (2007) *J.Biol.Chem.* 282, 20799-20803
19. Poirier, S., Mayer, G., Benjannet, S., Bergeron, E., Marcinkiewicz, J., Nassoury, N., Mayer, H., Nimpf, J., Prat, A., and Seidah, N. G. (2008) *J.Biol.Chem.* 283, 2363-2372
20. Li, J., Tumanut, C., Gavigan, J. A., Huang, W. J., Hampton, E. N., Tumanut, R., Suen, K. F., Trauger, J. W., Spraggon, G., Lesley, S. A., Liao, G., Yowe, D., and Harris, J. L. (2007) *Biochem.J.* 406, 203-207
21. Cunningham, D., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Griffor, M. C., Hawkins, J. L., Subashi, T. A., Varghese, A. H., Ammirati, M. J., Culp, J. S., Hoth, L. R., Mansour, M. N., McGrath, K. M., Seddon, A. P., Shenolikar, S., Stutzman-Engwall, K. J., Warren, L. C., Xia, D., and Qiu, X. (2007) *Nat.Struct.Mol.Biol.* 14, 413-419
22. Zhang, D. W., Lagace, T. A., Garuti, R., Zhao, Z., McDonald, M., Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2007) *J.Biol.Chem.* 282, 18602-18612
23. Kwon, H. J., Lagace, T. A., McNutt, M. C., Horton, J. D., and Deisenhofer, J. (2008) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 1820-1825

24. Hampton, E. N., Knuth, M. W., Li, J., Harris, J. L., Lesley, S. A., and Spraggon, G. (2007) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104, 14604-14609
25. Kotowski, I. K., Pertsemlidis, A., Luke, A., Cooper, R. S., Vega, G. L., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2006) *Am.J.Hum.Genet.* 78, 410-422
26. Benjannet, S., Rhainds, D., Hamelin, J., Nassoury, N., and Seidah, N. G. (2006) *J Biol.Chem.* 281, 30561-30572
27. Nour, N., Basak, A., Chretien, M., and Seidah, N. G. (2003) *J.Biol.Chem.* 278, 2886-2895
28. Dubuc, G., Chamberland, A., Wassef, H., Davignon, J., Seidah, N. G., Bernier, L., and Prat, A. (2004) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24, 1454-1459
29. Mayer, G., Hamelin, J., Asselin, M. C., Pasquato, A., Marcinkiewicz, E., Tang, M., Tabibzadeh, S., and Seidah, N. G. (2008) *J.Biol.Chem.* 283, 2373-2384
30. Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., and Weiss, W. (2000) *Electrophoresis* 21, 1037-1053
31. Kassam, G., Le, B. H., Choi, K. S., Kang, H. M., Fitzpatrick, S. L., Louie, P., and Waisman, D. M. (1998) *Biochemistry* 37, 16958-16966
32. Siever, D. A. and Erickson, H. P. (1997) *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 29, 1219-1223
33. Mai, J., Waisman, D. M., and Sloane, B. F. (2000) *Biochim.Biophys.Acta* 1477, 215-230
34. Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2007) *Trends Biochem.Sci.* 32, 71-77
35. Zibouche, M., Vincent, M., Illien, F., Gallay, J., and Ayala-Sanmartin, J. (2008) *J.Biol.Chem.*(in press)

36. Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1977) *Annu.Rev.Biochem.* 46, 897-930
37. Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (2006) *Science* 311, 1721-1723
38. Peterson, A. S., Fong, L. G., and Young, S. G. (2008) *J.Lipid Res.* 49, 1152-1156
39. Naureckiene, S., Ma, L., Sreekumar, K., Purandare, U., Lo, C. F., Huang, Y., Chiang, L. W., Grenier, J. M., Ozenberger, B. A., Jacobsen, J. S., Kennedy, J. D., DiStefano, P. S., Wood, A., and Bingham, B. (2003) *Arch.Biochem.Biophys.* 420, 55-67
40. Rescher, U. and Gerke, V. (2004) *J.Cell Sci.* 117, 2631-2639
41. Thiel, C., Osborn, M., and Gerke, V. (1992) *J.Cell Sci.* 103 (Pt 3), 733-742
42. Sagot, I., Regnouf, F., Henry, J. P., and Pradel, L. A. (1997) *FEBS Lett.* 410, 229-234
43. Stahlhut, M., Sandvig, K., and van Deurs, B. (2000) *Exp.Cell Res.* 261, 111-118
44. Deora, A. B., Kreitzer, G., Jacovina, A. T., and Hajjar, K. A. (2004) *J.Biol.Chem.* 279, 43411-43418
45. Cesarman, G. M., Guevara, C. A., and Hajjar, K. A. (1994) *J.Biol.Chem.* 269, 21198-21203
46. Ma, A. S., Bell, D. J., Mittal, A. A., and Harrison, H. H. (1994) *J.Cell Sci.* 107 (Pt 7), 1973-1984
47. Chung, C. Y. and Erickson, H. P. (1994) *J.Cell Biol.* 126, 539-548
48. Patchell, B. J., Wojcik, K. R., Yang, T. L., White, S. R., and Dorscheid, D. R. (2007) *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 293, L354-L363

49. Yeatman, T. J., Updyke, T. V., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R., and Nicolson, G. L. (1993) *Clin.Exp.Metastasis* 11, 37-44
50. Ling, Q., Jacovina, A. T., Deora, A., Febbraio, M., Simantov, R., Silverstein, R. L., Hempstead, B., Mark, W. H., and Hajjar, K. A. (2004) *J.Clin.Invest* 113, 38-48
51. Grefhorst, A., McNutt, M. C., Lagace, T. A., and Horton, J. D. (2008) *J.Lipid Res.* 49, 1303-1311
52. Satish, L., Lyons-Weiler, J., Hebda, P. A., and Wells, A. (2006) *Wound.Repair Regen.* 14, 463-470

Fig. 1 Mayer et al.

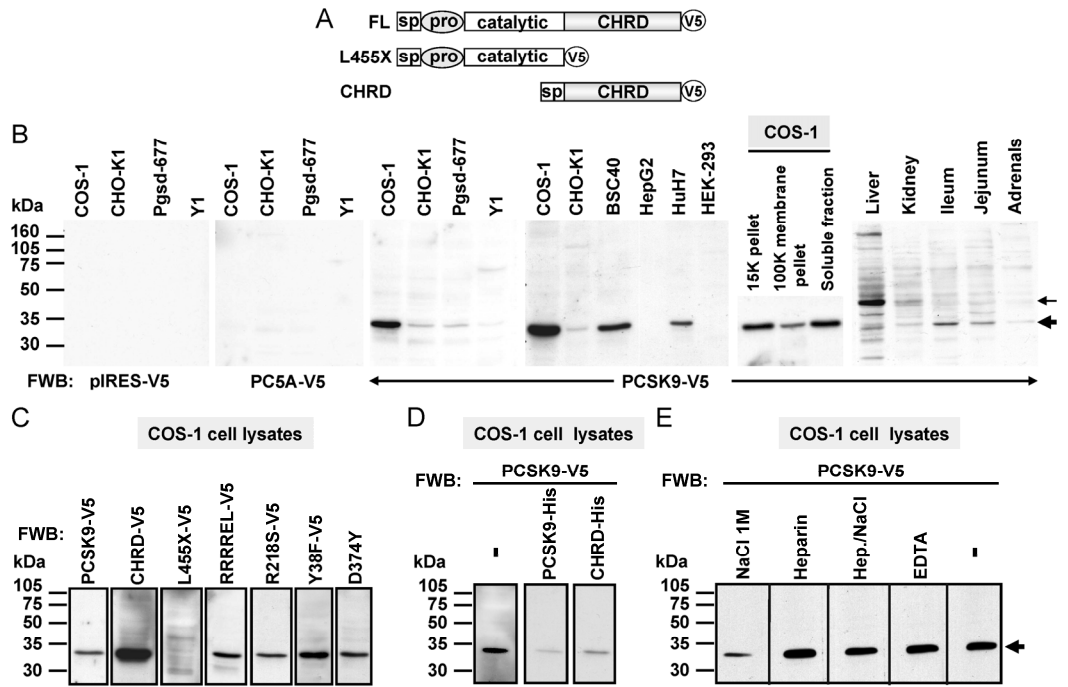


Fig. 2 Mayer et al.

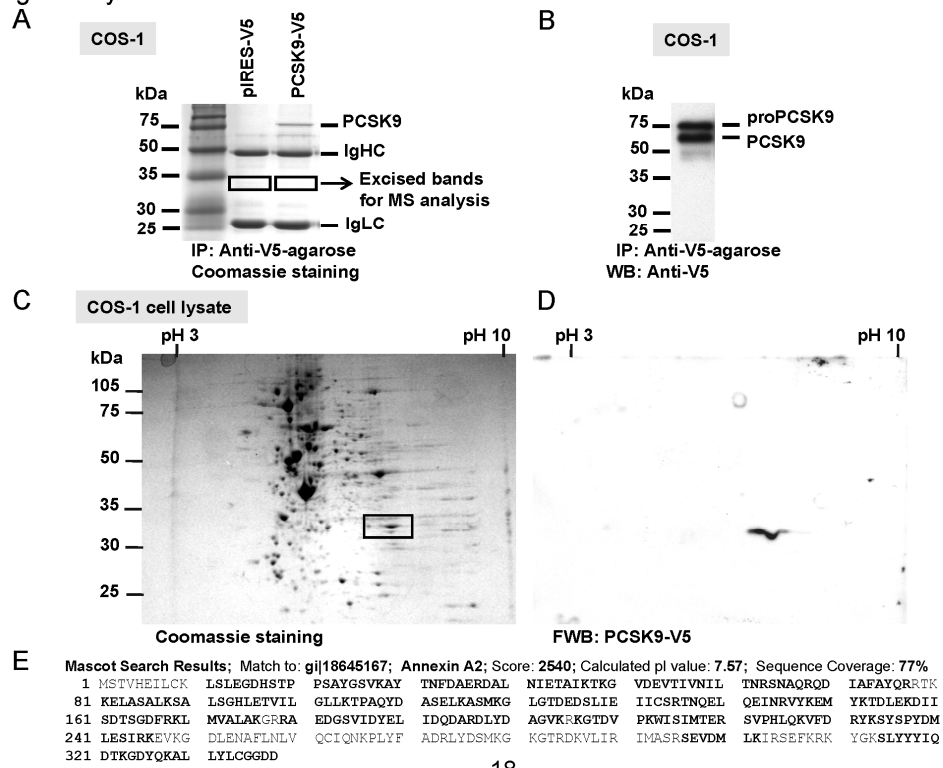


Fig. 3 Mayer et al.

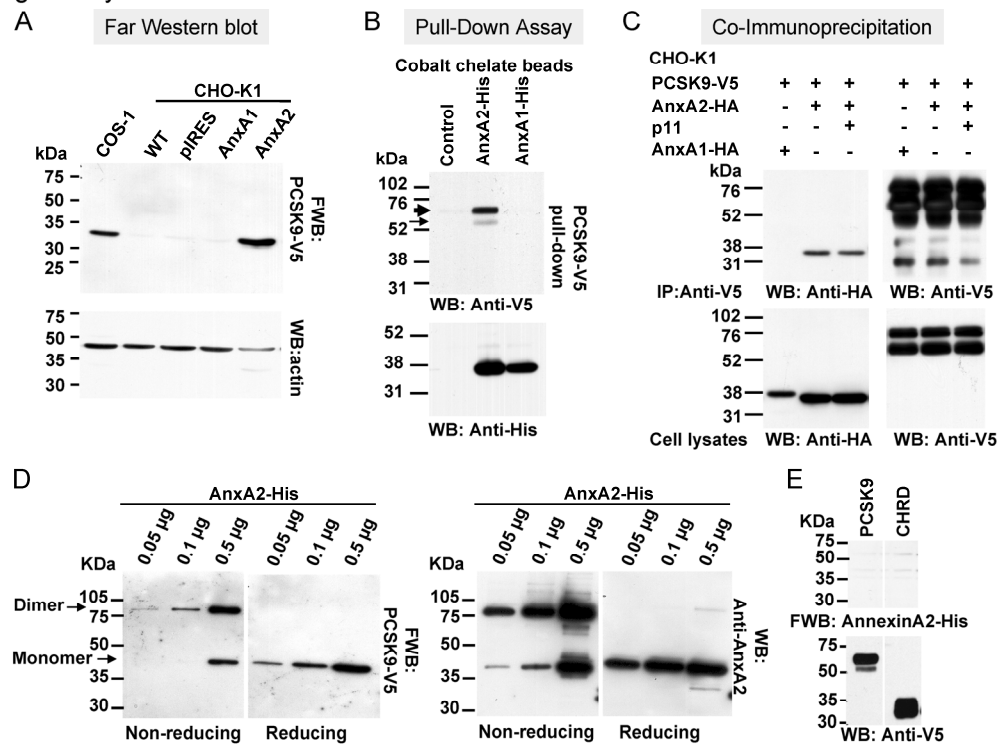


Fig. 4 Mayer et al.

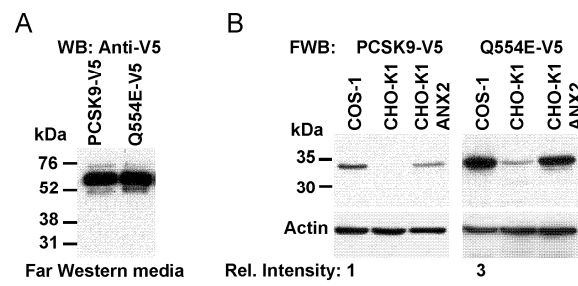


Fig. 5 Mayer et al.

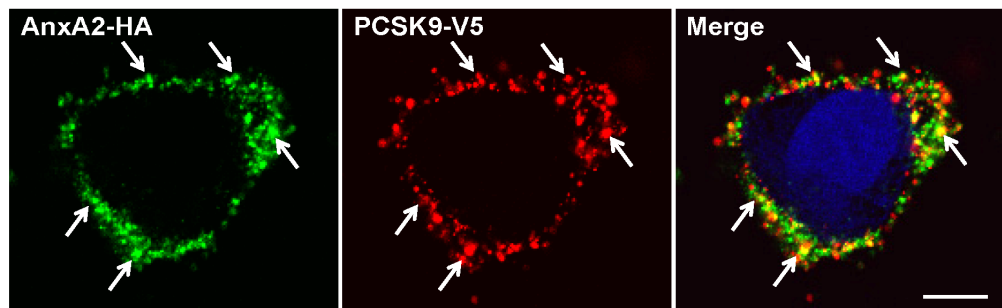


Fig. 6 Mayer et al.

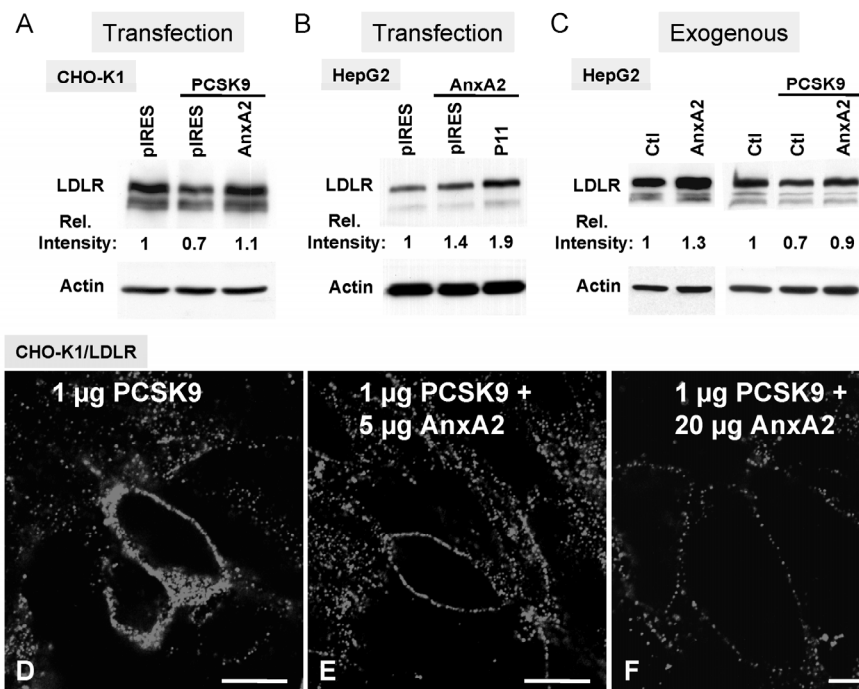


Fig. 7 Mayer et al.

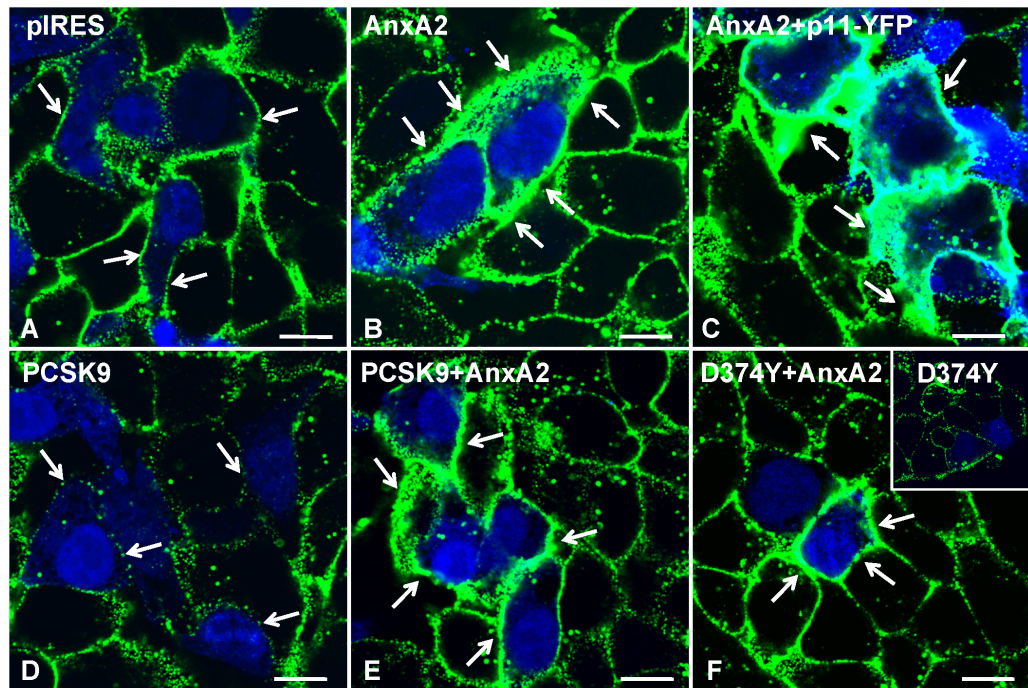


Fig. 8 Mayer et al.

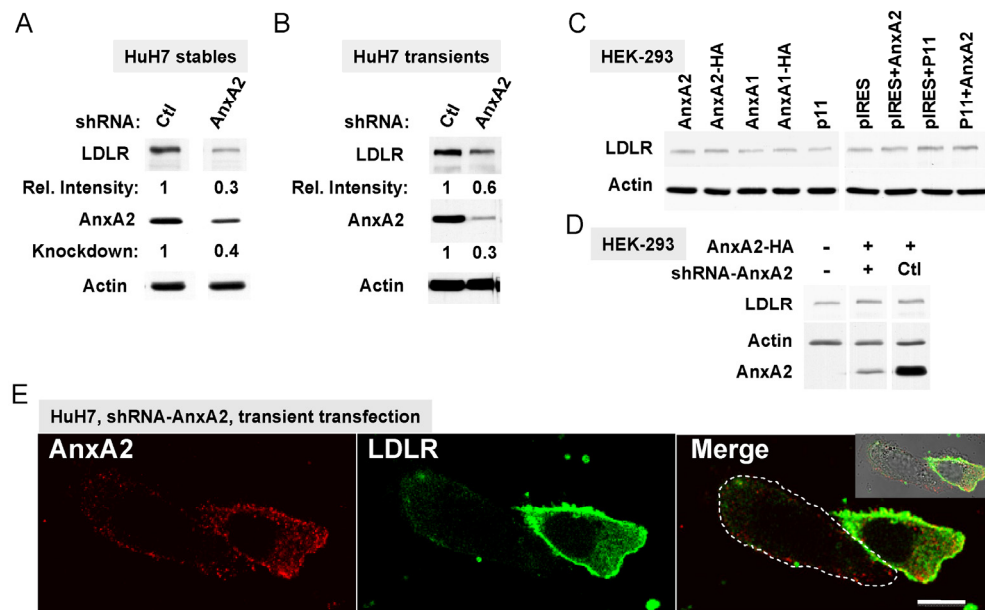


Fig. 9 Mayer et al.

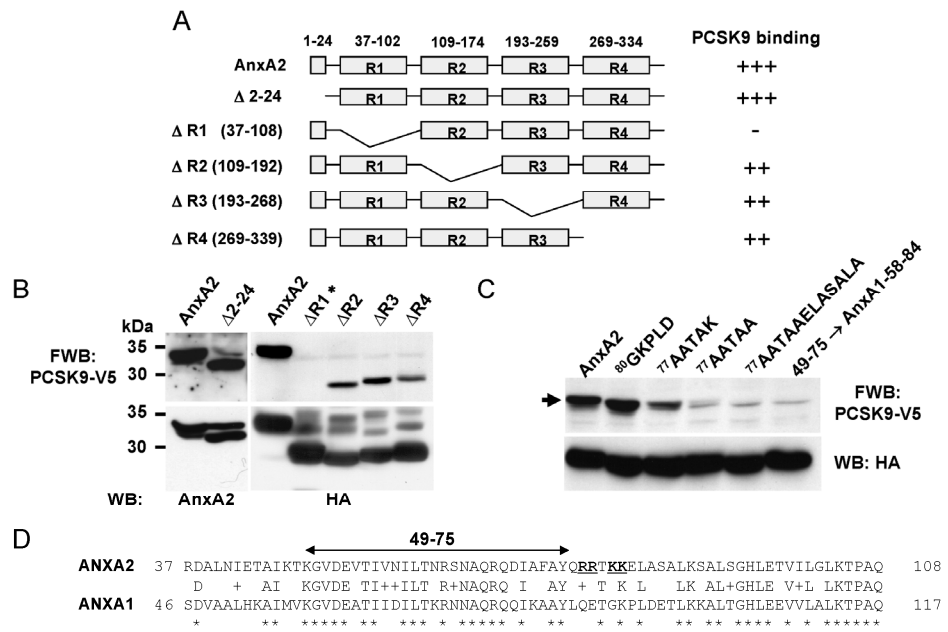
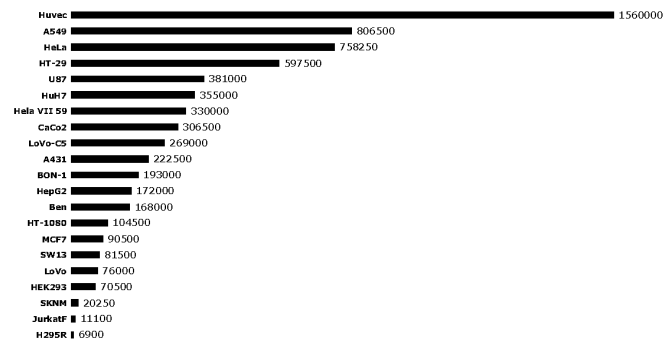
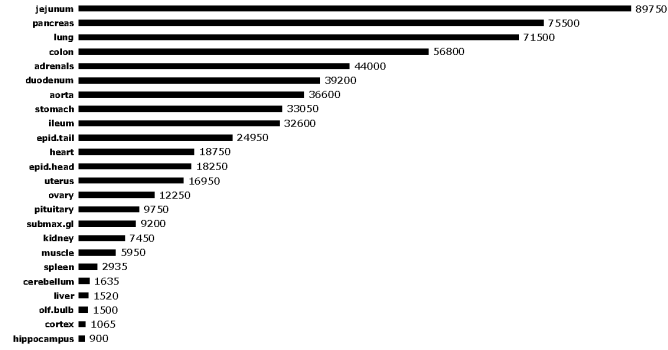


Fig. S1 Mayer et al.



	ANKA2	IC39
Human cell lines	7107 S14	7107 S14
Huvec	1560000	45
A549	806500	954
HeLa	758250	12483
HT-29	597500	1330
U87	381000	NA
Hep7	355000	50281
Hela VII 59	330000	NA
CaCo2	306500	42651
LoVo-C5	269000	17708
A431	222500	24794
BOH-1	193000	23660
HepG2	172000	76638
Ben	168000	579
HT-1080	104500	22
MCF7	90500	194
SW13	81500	NA
LoVo	76000	4400
HEK293	70500	79
SKNM	20250	2535
JurkatF	11100	1
H295R	6900	NA

Fig. S2 Mayer et al.



	ANKA2	PCNA9
Mouse Tissues	/10⁶ S18	/10⁶ S16
jejunum	89750	1263
pancreas	75500	0
lung	71500	0
colon	56800	9880
adrenals	44000	725
duodenum	39200	3756
aorta	36600	489
stomach	33050	420
ileum	32600	8056
epid.tail	24950	2068
heart	18750	249
epid.head	18250	409
uterus	16650	882
ovary	12250	570
pituitary	9750	435
submax.gland	9200	280
kidney	7450	2232
muscle	5950	0
spleen	2935	27
cerebellum	1635	905
liver	1520	73781
off.bulb	1500	0
cortex	1065	122
hippocampus	900	141

Chapitre V: Discussion

5.1 Rôles et cibles de PCSK9

5.1.1 Membres de la famille du LDLR

5.1.1.1 Fonctions biologiques

Il est maintenant bien documenté que PCSK9 joue un rôle majeur dans le métabolisme du LDL-cholestérol en induisant la dégradation du LDLR dans les hépatocytes favorisant le développement de maladies cardiovasculaires (*voir* Chapitre I.1.7). Comparativement au LDLR, les récepteurs ApoER2 et VLDLR possèdent des rôles biologiques distincts bien qu'ils partagent une forte homologie au niveau de leurs structures.²⁶⁸ Il fut observé que l'absence de ces deux récepteurs cause une sévère désorganisation du système nerveux central (SNC), illustrée par une mauvaise mise en place des couches neuronales dans le cortex, cervelet et bulbe olfactif.²⁶⁹ Ces anomalies importantes furent apparentées à un phénotype nommé « *reeler* » pour lesquelles le gène codant pour la protéine extracellulaire Reeline a été identifié.^{275, 276} Reeline fut donc définie comme ligand des récepteurs ApoER2 et VLDLR qui, lorsque liée, provoque la phosphorylation de la protéine cytosolique Dab1.²⁷⁷ Suite à l'activation de Dab1, une voie de signalisation provoque le transport et la migration de neurones vers leurs destinations finales dans les différentes couches du SNC.²⁷⁸ Bien qu'il existe une redondance entre ces deux récepteurs, il fut remarqué que l'ApoER2 est plutôt impliqué dans la migration des neurones du cortex comparativement au VLDLR, qui agit au niveau du développement du cervelet. Des mutations humaines invalidantes au locus du VLDLR furent corrélées avec le syndrome de « *Unertan* », caractérisé par une démarche quadrupédique, une dysarthrie (trouble de l'articulation de la parole), un retard mental et une hypoplasie du cervelet.²⁷⁹ Il fut aussi montré que l'absence de VLDLR favorise une activation des cellules endothéliales vasculaires rétiniennes menant à une angiogénèse.²⁸⁰ Le récepteur VLDLR est aussi présent dans les tissus périphériques tels le cœur, les muscles squelettiques et le tissu adipeux où il joue un rôle dans le métabolisme des lipides.²⁸¹ Bien que le profil lipidique sanguin ne

semble pas être affecté par l'absence de VLDLR, le récepteur participe à l'hydrolyse des lipoprotéines aux niveaux des adipocytes. En favorisant la libération d'acides gras à partir des lipoprotéines, le VLDLR participe donc au développement de l'adiposité où son absence fut corrélée avec une réduction de la masse adipeuse.²⁸² Il fut aussi remarqué que la surexpression hépatique du VLDLR, dans des souris déficientes pour le LDLR, peut réduire considérablement les taux de lipides plasmatiques engendrant une régression marquée des plaques athéromateuses.²⁸³ Chose intéressante, il fut aussi remarqué que certains membres de la famille du LDLR (LDLR, VLDLR et LRP1) sont des récepteurs pour une sous-classe de rhinovirus responsables du rhume chez les humains (HRV2 ; sérotype 2).²⁸⁴⁻²⁸⁹ En effet, il fut dénoté que la présence d'une forme soluble du VLDLR inhibe l'infectivité des rhinovirus et que le LDLR, particulièrement le domaine « *β-propeller* » (important pour le détachement des du complexe LDL•LDLR dans l'environnement acide des endosomes), serait est aussi impliqué dans la relâche de l'ARN viral dans les endosomes résultant en une augmentation de l'infectivité.²⁹⁰

5.1.1.2 PCSK9 et dégradation du LDLR, ApoER2 et VLDLR

Dans l'article 1 (Chapitre II), nous avons démontré que la surexpression de PCSK9 induit spécifiquement la dégradation du LDLR ainsi que les récepteurs ApoER2 et VLDLR.²⁹¹ Nous avons ensuite pris avantage des modèles cellulaires développés par Mayer *et coll.* et sélectionnés pour l'expression stable des récepteurs ApoER2 et VLDLR conjointement avec la protéine cytosolique Dab1, importante pour l'endocytose des récepteurs et la voie de signalisation de la réeline (*voir plus haut*).²⁷¹ Par analogie, nos résultats suggèrent que, comme pour le LDLR, la présence d'une protéine cytosolique adaptatrice (*e.g.* Dab1 et ARH) influe grandement sur la capacité de PCSK9 à induire la dégradation des récepteurs ApoER2 et VLDLR de manière exogène (par voie extracellulaire ; Chapitre II, Fig.1, 5 et 6). De plus, nos collaborateurs ont testé l'implication relative des queues cytosoliques des récepteurs ApoER2 et VLDLR.²⁹² Pour ce faire, plusieurs protéines fusions furent générées où les domaines extracellulaires et/ou

intracellulaires furent interchangeés entre les deux récepteurs (*voir* Fig. 8). Nous avons remarqué que PCSK9 induit la dégradation des récepteurs ApoER2 et VLDLR indépendamment de la nature de leurs queues cytosoliques. Il faut se rappeler qu'elles partagent une capacité similaire de liaison pour la protéine Dab1, importante pour l'endocytose et la signalisation par ces récepteurs. Ceci suggère que la contribution d'un facteur cytosolique est important dans l'action extracellulaire de PCSK9 sur les membres de la famille du LDLR.

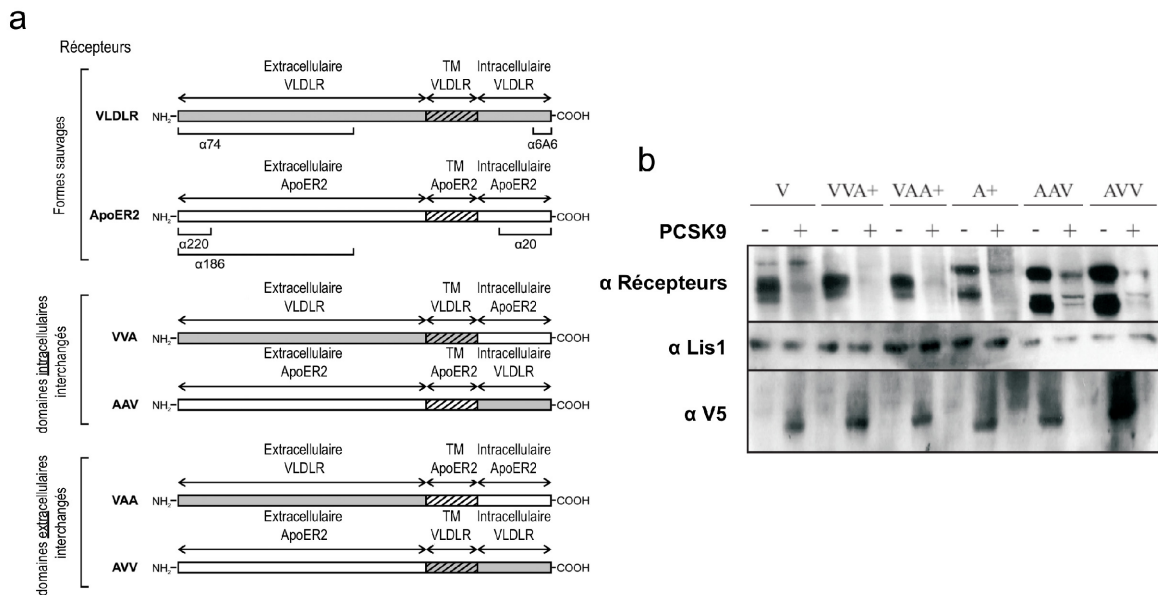


Figure 8 PCSK9 induit la dégradation des récepteurs ApoER2 et VLDLR indépendamment de la nature de leurs queues cytosoliques. (a) Schéma représentant les différentes constructions de récepteurs fusions (domaines intra- et/ou extracellulaires des récepteurs ApoER2 et/ou VLDLR furent interchangeés).²⁹² (b) Les différents récepteurs furent ensuite transfectés dans les cellules NIH 3T3 sans (-) ou avec (+) PCSK9. Les niveaux résiduels de récepteurs furent ensuite analysés par immunobuvardage à l'aide d'anticorps propres à chacun (α Récepteurs). Les niveaux de PCSK9 (α V5) et du normalisateur Lis1 (α Lis1) furent aussi révélés. (V ; VLDLR, A ; ApoER2, TM ; domaine transmembranaire, NH₂ ; région N-terminale, COOH ; région C-terminale).

Ensuite, nous avons évalué l'apport de l'activité enzymatique de PCSK9 sur la dégradation des récepteurs de la famille du LDLR. Nous nous sommes donc inspiré d'une étude montrant que l'induction de la dégradation du LDLR par PCSK9, ne semble pas dépendre de son activité catalytique intrinsèque.²³² Il est important de se rappeler que la mutation d'un des résidus du site catalytique de PCSK9 (*e.g.* H226A ; histidine du site actif) provoque la rétention de l'enzyme dans le réticulum endoplasmique dû à une absence de son autoactivation¹²⁶. Contrairement aux autres convertases, il fut possible de contourner cette contrainte en exprimant séparément, et de concert, la prorégion de PCSK9 (importante pour le repliement des convertases ; *voir* Chapitre I.1.6.2) et la reste de la protéine (domaine catalytique et CHRD) soit de forme sauvage ou mutée (*e.g.* H226A). Cette stratégie favorise la formation de complexes mimant la coupure autocatalytique (proPCSK9• Δ proPCSK9 ou proPCSK9• Δ proPCSK9-H226A) et permet donc la sécrétion de PCSK9 dans l'espace extracellulaire (catalytiquement active ou inactive). Par conséquent, nous avons pu démontrer que l'activité de PCSK9 n'est pas essentielle pour l'induction de la dégradation du LDLR, ainsi que pour les membres ApoER2 et VLDLR (Chapitre II, Fig.2). Par immunocytochimie, nous avons aussi illustré que le complexe ainsi formé (proPCSK9• Δ proPCSK9) se retrouve bien colocalisé dans les endosomes tardifs/lysosomes comparable à la forme intégrale.

5.1.1.3 Liaison de PCSK9 au LDLR, ApoER2 et VLDLR

À partir de cellules déficientes pour le LDLR (CHO-I_dLA7)²⁹³, nous avons ensuite généré des lignées stables exprimant les récepteurs ApoER2 ou VLDLR (ApoER2-A7 et VLDLR-A7). Nous avons d'abord remarqué que l'absence de LDLR n'affecte pas la capacité de PCSK9 à induire la dégradation des récepteurs ApoER2 et de VLDLR (Chapitre II, Fig.3). De plus, la présence de ces récepteurs augmente considérablement l'attachement cellulaire de PCSK9, et d'autant plus pour la forme D374Y (mutation humaine provoquant un « *gain-de-fonction* » ; hypercholestérolémie), lorsque celles-ci furent incubées sur les surexprimants stables. Nous avons aussi dénoté que la surexpression

du LDLR dans les lignées stables LDLR-déficientes (ApoER2-A7 et VLDLR-A7), provoque une association synergique de PCSK9 aux cellules. Ceci suggère que PCSK9 lie de manière non-compétitive et additive les récepteurs de la famille du LDLR (Chapitre II, Fig. 4). À pH neutre, PCSK9 s'associe directement au LDLR avec un $K_D \sim 169$ nM (constante de dissociation). À pH acide, non seulement PCSK9 lie beaucoup plus fortement le LDLR, mais il y a présence de deux formes possédant des affinités différentes ($K_D \sim 1$ et 42 nM).¹⁶⁸ Pour ce qui est du mutant naturel D374Y, on remarque une augmentation considérable de l'affinité de PCSK9 pour le LDLR à pH neutre ($K_D \sim 6$ nM). De plus, il semble que cette mutation abolie le gain d'affinité qu'a PCSK9 de forme sauvage pour le LDLR à pH acide ($K_D \sim 6$ nM, pH 7.5 vs $K_D \sim 1.6$ nM, pH 5.4). En contre partie, la mutation H306Y (résidu correspondant à la liaison au LDLR) engendre aussi un gain d'affinité pour PCSK9 de type sauvage au récepteur.²⁴⁴ Cette position critique (PCSK9-D374 vs LDLR-H306) semble être responsable de l'augmentation de l'affinité de PCSK9 pour le LDLR à pH acide. Puisque le noyau imidazole des histidines (H306 du LDLR) dispose d'un atome d'azote pouvant capter un proton ($pK_a \sim 6.8$), il s'avère que le pH acide de certains compartiments cellulaires (endosomes tardifs/lysosomes ; ET/L) joue fort probablement un rôle clé dans le mécanisme de liaison et de dégradation du LDLR par PCSK9. Comparativement à la forme sauvage, nous avons aussi remarqué que le mutant D374Y s'associe plus fortement aux cellules exprimant les récepteurs LDLR, ApoER2 et VLDLR (Chapitre II, Fig.3 et 4).

5.1.1.4 Analyses cristallographiques

Une étude a démontré que le domaine EGF-A²⁴⁰ (*epidermal growth factor-like A*) du LDLR est responsable pour l'attachement de PCSK9 au récepteur.²⁴¹ De manière plus spécifique, une analyse cristallographique a illustré que la surface du domaine catalytique, et non la pochette enzymatique de PCSK9, lie directement le domaine EGF-A du LDLR (*voir* Chapitre I.1.7.1).²⁴³ Le domaine EGF-AB, conjointement avec l'environnement acide des endosomes tardifs/lysosomes, est impliqué dans la relâche du complexe LDL•LDLR et

le recyclage du récepteur à la surface membranaire.^{79, 124, 294} Cette région de 42 acides aminés (résidus 294-332) est située après le domaine de liaison aux apolipoprotéines (R1 à R7) et le domaine EGF-B, qui est suivi du domaine « *β-propeller* ».^{78, 240} Le domaine EGF-A, apparenté à un ressort, nécessite la liaison d'un ion calcium pour la mise en place de sa structure tertiaire. En effet, il fut observé que la présence d'EDTA (acide éthylène-diamine tétra-acétique), un puissant chélateur d'ions métalliques, prévient complètement la liaison de PCSK9 au LDLR, ce qui suggère que le maintien de la structure tertiaire native est primordial pour la formation du complexe.²⁴¹ En effet, il fut aussi observé, par mutagenèse dirigée, que les résidues impliqués dans la liaison du calcium à l'EGF-A (N295A, E296A, D310A, Y315A) sont importants pour la liaison de PCSK9.

Par ailleurs, les auteurs ont proposé que l'interaction entre PCSK9 et le domaine EGF-A du LDLR est spécifique puisque le domaine EGF-A du VLDLR ne semble pas lier PCSK9 (VLDLR ; EGF-A, acides aminés 329-368).²⁴¹ L'échange des domaines EGF-A entre les deux récepteurs (*i.e.* EGF-A du LDLR dans la séquence correspondante du VLDLR) permet maintenant au récepteur chimérique VLDLR/EGF-A_LDLR de lier PCSK9. Plus spécifiquement, ils ont proposé que la leucine en position 318 (L318) du LDLR est critique pour la liaison de PCSK9 au récepteur et que le résidu correspondant (D354) dans le VLDLR, n'est donc pas permissif à la formation du complexe. Par mutagenèse, la mutation L318D dans le LDLR (résidu correspondant au VLDLR) prévient la liaison de PCSK9 au récepteur et *vice versa* (D354L, résidu correspondant au LDLR dans le VLDLR lui permet donc d'interagir avec PCSK9). Il est important de noter que ces séries d'expériences furent réalisées avec les cellules COS-M (lignée dérivée du rein de singe) et qu'ils ont évalué la liaison de PCSK9 sur de courtes périodes de temps. Contrairement à ce que suggère cette étude, nous avons remarqué que la présence des récepteurs ApoER2 ou VLDLR favorise la liaison de PCSK9 dans le modèle cellulaire CHO-IId1A7 (cellules déficientes pour le LDLR ; Chapitre II, Fig.3). Depuis notre publication dans le *Journal of Biological Chemistry* sur l'identification d'ApoER2 et VLDLR comme nouvelles cibles de PCSK9, plusieurs groupes ont appuyé et confirmé que

PCSK9 peut lier directement et spécifiquement le LDLR ainsi que les récepteurs ApoER2 et VLDLR.^{267, 270} En effet, une première étude de liaison *in vitro* montre que PCSK9 lie spécifiquement les récepteurs LDLR ($EC_{50} = 0.3$ nM), ApoER2 ($EC_{50} = 28.2$ nM) et VLDLR ($EC_{50} = 3.0$ nM) selon différentes affinités. En plus de valider ces résultats, une autre équipe a évoqué que PCSK9 interagit directement avec les récepteurs LDLR, ApoER2 et VLDLR avec des affinités comparables (LDLR ; $K_D = 386$ nM, ApoER2 ; $K_D = 516$ nM, VLDLR ; $K_D = 379$ nM).

Par analyse cristallographique, on remarque que la surface d'interaction du complexe PCSK9•EGF-A est plutôt de type hydrophobique avec quelques ponts hydrogène et liaisons salines (*voir* Fig. 9a).²⁴³ Le résidu phénylalanine en position 379 de PCSK9 (F379) est au centre d'une surface hydrophobe qui participe à de nombreuses liaisons avec le domaine EGF-A. On remarque aussi que lorsque PCSK9 s'associe au domaine EGF-A du LDLR, il y a bris du pont salin intramoléculaire entre les résidus R194•E197 de PCSK9 au profit d'une nouvelle liaison ionique avec le LDLR (R194•D310). Pour ce qui est des ponts hydrogène, les résidus impliqués dans le complexe PCSK9•EGF-A sont les suivants : D238•N295 et T377•N309. Lors du clivage autocatalytique de PCSK9 en position Q152, le groupement amine du résidu S153 nouvellement libéré forme aussi un pont hydrogène avec l'acide aspartique D299 du LDLR (S153•D299). Par mutagenèse dirigée, il fut montré que les acides aminés N295 et D310 situés dans la séquence de l'EGF-A du LDLR sont cruciaux pour la liaison de PCSK9 au récepteur.²⁴¹ On remarque que ces résidus sont parfaitement conservés entre les espèces pour le LDLR ainsi que pour les récepteurs ApoER2, VLDLR et LRP1 (*voir* Fig. 9c). En comparant les séquences primaires du LDLR humain (hLDLR) à la position 309 (N309) avec le LDLR murin (mLDLR) et le VLDLR (hVLDLR), on remarque que l'asparagine (N) est remplacée par une lysine (K) à cette position (*voir* Fig. 9c). À partir d'hépatocytes primaires de souris, nous avons observé que l'ajout de PCSK9 humain induit aussi bien la dégradation du LDLR humain que murin, suggérant que le résidu en position N309 du LDLR, et les correspondants (mLDLR et hVLDLR) ne soient pas essentiels à la formation du complexe

PCSK9•EGF-A.²⁹⁵ Par contre, il sera aussi pertinent d'évaluer l'affinité de PCSK9 inter-espèces avec le LDLR humain et murin de manière *in vitro*.

On remarque aussi qu'il existe une grande proximité entre les résidus D374 de PCSK9 et H306 du LDLR (*voir* Fig. 9b). Il est important de se rappeler que les mutations naturelles hypercholestérolémiantes D374Y ou H306Y augmentent considérablement l'affinité de PCSK9 pour le LDLR. De plus, cette position joue un rôle clé dans l'accroissement de la formation du complexe dans les compartiments acides tels les endosomes tardifs/lysosomes. Par conséquent, la protonation de l'histidine du LDLR (H306) permet donc la formation d'un pont hydrogène avec le résidu D374 de PCSK9. Pour les mutants D374Y et H306Y, l'effet du pH est sans conséquence puisqu'il y a déjà formation de la dite liaison hydrogène expliquant ainsi leurs caractères « *gain-de-fonction* ». L'histidine en position 306 du LDLR (H306) est conservée entre les diverses espèces ainsi que pour les récepteurs ApoER2 et VLDLR (Fig. 9c). En effet, nous avons observé que, comme pour le LDLR, le mutant PCSK9-D374Y lie beaucoup plus efficacement les récepteurs ApoER2 et VLDLR, comparativement à la forme sauvage (Chapitre II ; Fig. 3-4). Bien que le récepteur LRP1 (membre de la famille du LDLR) possède en partie la signature des résidus critiques pour la liaison de PCSK9 aux membres de la famille du LDLR (N295, D310 ; Fig. 9c), il fut remarqué que la surexpression ou l'absence de PCSK9 n'affecte pas ses niveaux protéiques, donc possiblement son taux de dégradation intracellulaire.^{138, 225} Par contre, il n'est pas impossible que PCSK9 interagisse avec la LRP1 avec une affinité différente. On remarque aussi que l'histidine correspondante du LDLR (H306) est remplacée par une glutamine (Q) dans la séquence de la LRP1 (Fig. 9c). On peut donc imaginer que PCSK9 pourrait lier le récepteur LRP1, sans qu'il soit dégradé puisque l'histidine (importante pour la sensibilité au pH de PCSK9) n'est pas présente et donc possiblement pas d'augmentation de liaison de PCSK9 pour ce récepteur à pH acide. Si le mécanisme de dégradation des récepteurs de la famille du LDLR implique nécessairement un changement de pH, la LRP1 joue peut-être un rôle dans le transport cellulaire de PCSK9 sans toutefois être dégradé par celle-ci.

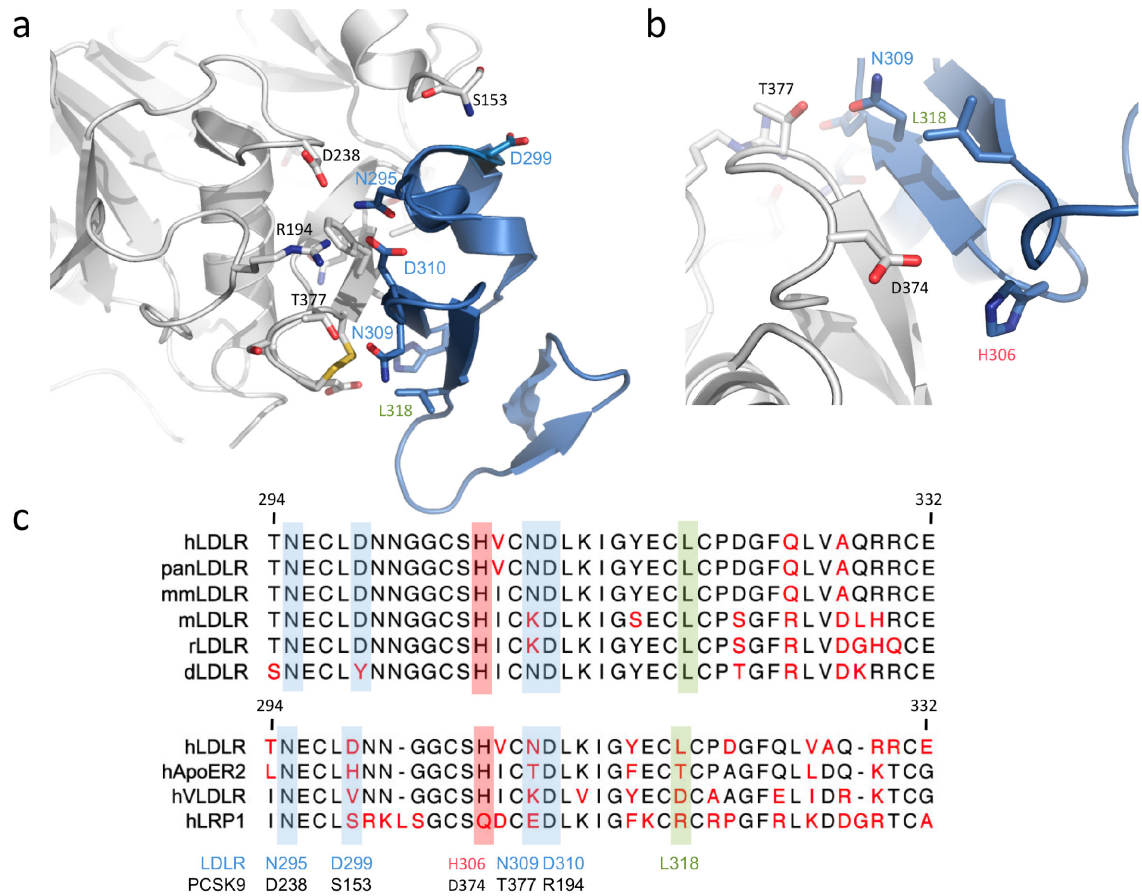


Figure 9 Analyse comparative des séquences « EGF-A » des membres de la famille du LDLR. (a) structure du complexe PCSK9•LDLR(EGF-A) déterminée à partir de MacPymol (PDB 3BPS). Les résidus principalement impliqués sont représentés : PCSK9 (gris) et LDLR(EGF-A); (bleu) S153•D299, D238•N295, R194•D310, T377•N309, et L318. (b) structure du complexe PCSK9•LDLR(EGF-A) déterminée à partir de MacPymol (PDB 3BPS). Les résidus principalement impliqués dans les mutations naturelles « gain-de-fonction » D374Y (PCSK9) et H306Y (LDLR) sont représentés pour les formes sauvages soit : PCSK9 (gris) et LDLR(EGF-A); (bleu) D374•H306. (c) Alignement de séquences codant pour le domaine EGF-A du LDLR de différentes espèces réalisé à l'aide de CLC Workbench (h, *Homo sapiens*; pan, *Pan troglodytes*; mm, *Macaca mulatta*; m, *Mus musculus*; r, *Rattus norvegicus*; d, *Danio rerio*). Alignement des séquences humaines correspondantes au EGF-A des récepteurs de la famille du LDLR (hLDLR, hApoER2, hVLDLR, hLRP1). Les résidus impliqués dans la formation du complexe PCSK9•LDLR(EGF-A) et les correspondants (alignements inter-espèces et autres récepteurs) sont surlignés et les indiqués en bas (LDLR, bleu; PCSK9, noir). À noter que la numérotation est basée sur la séquence EGF-A du hLDLR soit des acides aminés 294 à 332.

5.1.1.5 Fusion de Lamp1 et PCSK9

Dans l'article 1 (Chapitre II), nous avons aussi développé une approche pour favoriser le transport de PCSK9 dans les compartiments acides (endosomes tardifs/lysosomes, ET/L), où elle induit la dégradation des récepteurs de la famille du LDLR.¹⁷⁸ À titre d'exemple, notre laboratoire a déjà démontré que la fusion du domaine transmembranaire (TM) ainsi que la queue cytosolique (CT) de la protéine Lamp1 (L1 ; *lysosomal-associated membrane protein*) à des protéines solubles, redirige ces chimères vers les ET/L. En effet, il fut possible d'identifier certains complexes protéiques en évaluant le taux de dégradation d'un des partenaires dans les lysosomes.^{172, 296} Nous avons d'abord remarqué que la construction PCSK9-L1 (fusion de Lamp1 à PCSK9) accentue grandement la capacité de PCSK9 à dégrader le LDLR dans des compartiments acides et ce, de manière spécifique (Chapitre II, Fig. 7 et 8). De plus, nous avons remarqué que, comparativement à la forme soluble (constitutive), PCSK9-L1 colocalise davantage avec le CI-MPR (*cation-independant mannose-6-phosphate receptor*), marqueur des ET/L. Nous avons finalement observé que la fusion de Lamp1 à PCSK9 lui confère un pouvoir accru quant à l'induction de la dégradation des récepteurs ApoER2, VLDLR et LDLR indépendamment du type cellulaire testé (Chapitre II, Fig. 9). Nous avons donc pu valider que l'utilisation de PCSK9-L1 s'apparente à la fonction biologique de PCSK9 de forme native (soluble). Cette approche s'avère donc être une stratégie intéressante qui permettra peut-être d'identifier d'éventuels partenaires ou autres récepteurs sensibles à PCSK9.

5.1.1.6 Régulation *in vivo* des récepteurs par PCSK9

Nous avons préalablement réalisé une étude qui démontre que PCSK9 est transitoirement exprimée dans des centres neurogéniques tels le télencéphale, cervelet et bulbe olfactif.¹²⁶ Chez le poisson-zèbre, nous avons remarqué que l'atténuation génique de PCSK9 résulte en une forte désorganisation du système nerveux central (SNC) conduisant à une létalité embryonnaire.¹⁸⁷ Puisque les récepteurs ApoER2 et VLDLR sont aussi impliqués dans la mise en place de structures neuronales²⁶⁹, nous avons donc comparé

l'expression de PCSK9 et de ces récepteurs chez la souris au premier jour après la naissance. On remarque que l'expression de PCSK9 dans le cervelet est complémentaire à celle du VLDLR, tandis qu'ApoER2 semble être plutôt diffus. Bien qu'il soit donc possible que la PCSK9 sécrétée puisse moduler les niveaux de VLDLR dans le cervelet, aucune anomalie évidente du SNC fut observée dans les souris déficientes pour la PCSK9 (*Pcsk9*^{-/-}).^{138, 139, 154} Contrairement au poisson-zèbre, il est donc possible que l'effet engendré par l'absence de PCSK9 chez la souris soit compensé par un autre gène redondant ou que le taux protéique ou de phosphorylation de Dab1 (effectrice dans la signalisation de la réeline lors de la liaison aux récepteurs ApoER2 et VLDLR) soit par conséquent modulé. Une étude récente a montré que les niveaux d'ApoER2 et VLDLR ne sont pas modifiés dans les différentes régions du cerveau chez la souris adulte déficiente pour la PCSK9.²⁷⁰ Il est important de se rappeler que PCSK9 n'est pas exprimée dans le cerveau adulte mais plutôt au cours du développement embryonnaire. Une étude récente a révélé que l'absence du récepteur nucléaire LXR β (souris déficientes ; *LXR β* ^{-/-}) cause une réduction des niveaux du récepteur ApoER2 dans le cortex, ce qui occasionne un retard de migration des neurones au cours du développement embryonnaire. Fait intéressant, ils ont aussi observé que ces anomalies sont corrigées plus tard dans le développement suggérant une plasticité du système nerveux central. Il est donc possible que PCSK9 soit d'une part régulée par le récepteur LXR β dans le cortex (modulant les niveaux d'ApoER2) et que, comme observé avec les souris *LXR β* ^{-/-}, les souris déficientes pour la PCSK9 (*Pcsk9*^{-/-}) pourrait compenser de manière similaire pour les changements de niveaux des récepteurs ApoER2 et VLDLR au cours du développement cérébral. Une étude systématique sur l'effet potentiel de PCSK9 sur les récepteurs ApoER2 et VLDLR au cours du développement embryonnaire, et non chez l'adulte, reste à être démontrée.

Il fut remarqué, à l'aide de souris de type sauvage ou déficientes pour le LDLR, que la présence du LDLR est responsable d'une clairance rapide de PCSK9 ($t_{1/2} \sim 5$ min) lorsque celle-ci fut injectée dans la circulation sanguine. Par contre, on dénote qu'outre la clairance LDLR-dépendante, il existe une autre constante plus lente impliquée dans la

clairance de PCSK9 ($t_{1/2} \sim 15$ min).²⁹⁷ Il est donc possible d'imaginer que d'autres récepteurs (*e.g.* ApoER2, VLDLR, LRP1, etc.) contribuent à la rétention et/ou la clairance de PCSK9 dans la circulation sanguine. Pour distinguer l'apport de chacun de ces récepteurs, il serait très informatif de répéter l'expérience et d'évaluer la clairance de PCSK9 dans des souris doublement déficientes pour les récepteurs LDLR et VLDLR. Aussi, il serait intéressant d'évaluer la dégradation du VLDLR dans les tissus extra-hépatiques dans des souris déficientes pour le LDLR, à savoir si ces souris seraient plus sensibles à la présence de PCSK9 et propice au développement de l'obésité. D'ailleurs, étudier l'impact de la surexpression du LDLR et/ou VLDLR dans les tissus extra-hépatique pourrait aussi nous permettre d'évaluer l'effet résiduel de PCSK9 (réduction possible de la biodisponibilité de PCSK9) sur la dégradation du LDLR hépatique. Cette approche indirecte pourrait nous informer sur le potentiel modulateur de ces récepteurs (augmentation possible de la rétention de la PCSK9 circulante) qui pourrait être envisagé comme stratégie pour réduire la dégradation du LDLR dans le foie et ainsi réduire le nombre de particules LDL circulantes.

À l'aide de souris génétiquement modifiées, nous avons pu démontrer que les hépatocytes contribuent essentiellement à la sécrétion de PCSK9 dans la circulation sanguine.¹³⁹ Nous avons donc évalué la capacité de PCSK9 à dégrader le LDLR de manière extra-hépatique. Pour ce faire, nous avons pris avantage des modèles de type sauvage (*Pcsk9*^{+/+}), déficientes pour PCSK9 (*Pcsk9*^{-/-}) et surexprimant PCSK9 dans les hépatocytes (*Tg-Pcsk9-V5* ; Fig. 19, Annexe 3). On remarque que dans les hépatocytes (Foie), les niveaux du LDLR sont sensibles à la présence de PCSK9. Par immunobuvardage, nous n'avons observé aucune différence quant au taux de LDLR dans les surrénales (tissu riche pour le LDLR) entre les souris *Pcsk9*^{+/+} et *Pcsk9*^{-/-}. Par contre, dans les souris *Tg-Pcsk9-V5*, la surabondance de PCSK9 induit la dégradation du LDLR dans les hépatocytes ainsi que les surrénales. À l'aide de l'anticorps V5 (étiquette fusionnée à PCSK9), on dénote la présence de la forme proPCSK9-V5 révélatrice d'une surexpression locale de PCSK9 à l'intérieur même des surrénales.¹³⁹ En somme, nous pouvons déduire que la présence

endogène de PCSK9 dans la circulation sanguine ne semble pas affecter les niveaux du LDLR dans les tissus extra-hépatiques.

Nous avons ensuite évalué la capacité de PCSK9 à moduler les niveaux de VLDLR qui joue un rôle dans l'apport en acides gras, à partir des apolipoprotéines, pour les tissus périphériques (*voir* Chapitre I.1.4.1). Il est important de se rappeler que le VLDLR n'est pas présent dans le foie mais est exprimé de manière endogène dans le cœur, les muscles squelettiques, et le rein, tout particulièrement dans les cellules endothéliales, sans toutefois exprimer PCSK9.^{126, 139, 291, 298, 299} Pour ces tissus, l'apport de PCSK9 provient donc de la circulation sanguine dicté essentiellement par les hépatocytes. Par immunoprécipitation, nous avons remarqué une diminution des niveaux du VLDLR dans le cœur en présence de PCSK9 lorsque surexprimée dans les hépatocytes (*Tg-PCSK9* ; Fig. 10). Par contre, comme observé pour le LDLR (Fig. 19, Annexe 3), la PCSK9 circulante endogène ne semble pas affecter les taux de VLDLR dans le cœur (*Pcsk9^{+/+}* vs *Pcsk9^{-/-}*, Fig. 10). Contrairement au LDLR dans les surrénales, cette dégradation extra-hépatique semble venir de la surabondance plasmatique de PCSK9 puisque nous n'avons détecté aucun signal quant à la forme proPCSK9 dans le cœur (*voir* plus haut ; Fig. 19, Annexe 3 vs Fig. 10). Une étude récente a révélé que, chez des patients diabétiques de type 2 traités avec des statines (Chapitre I.1.2.1), les niveaux circulants de PCSK9 et des particules VLDL sont réduits suite à un traitement aux fénofibrates.²²² Il fut suggéré que la réduction des particules VLDL, chez ces patients, pourrait être modulée par une hausse du récepteur VLDLR dû à une réduction des niveaux de PCSK9 plasmatique. La corrélation *in vivo* entre les rôles physiologiques de PCSK9 dans la modulation du VLDLR, et de ces possibles conséquences sur le développement de l'adiposité et du métabolisme des VLDL reste à être démontrée.

5.1.2 Le récepteur CD81 et le virus de l'hépatite C (VHC)

Outre les récepteurs de la famille du LDLR, notre laboratoire a démontré que PCSK9 module aussi le niveau du récepteur CD81.³⁰⁰ En effet, la présence de PCSK9

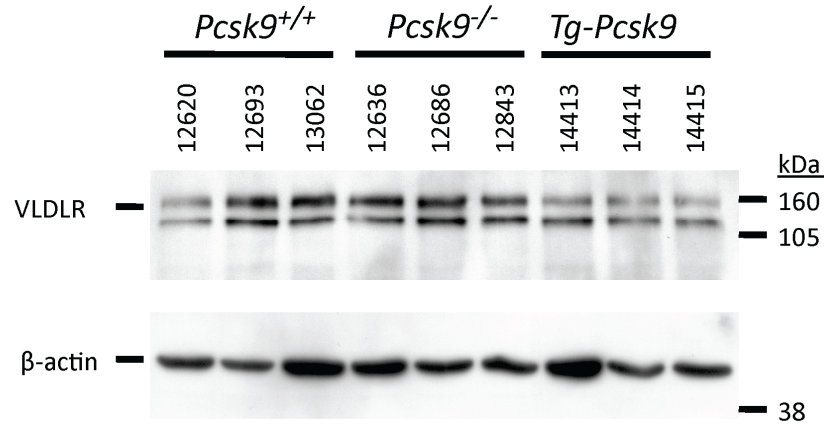


Figure 10 Diminution des niveaux protéiques du VLDLR dans le cœur de souris surexprimant PCSK9 dans les hépatocytes. À partir de 1 mg provenant d'extraits protéiques de cœur de souris de type sauvage (*Pcsk9*^{+/+}), déficientes pour PCSK9 (*Pcsk9*^{-/-}) ou surexprimant PCSK9 dans les hépatocytes (*Tg-Pcsk9*)¹³⁹, le récepteur VLDLR fut immunoprécipité (R&D Systems; 1:250 + 40μl A/G agarose) et déposé sur gels d'acrylamide et ensuite révélé à l'aide d'un anticorps VLDLR (R&D Systems; 1 :1000). Un aliquot du surnageant fut déposé sur gel et révélé avec un anticorps dirigé contre la β-actine utilisé comme normalisateur. À noter que pour chaque génotype, trois animaux furent utilisés (*Pcsk9*^{+/+}; 12620-12693-13062, *Pcsk9*^{-/-}; 12636-12686-12843, *Tg-Pcsk9*; 14413-14414-14415).

induit la dégradation de CD81 de manière LDLR-indépendante. Il fut rapporté que l'infectivité du virus de l'hépatite C (VHC) peut dépendre des plusieurs récepteurs dont le CD81,³⁰¹ SR-B1 (*scavenger receptor class B type I*),³⁰² LDLR,³⁰³ claudin-1, 6, 9³⁰⁴ et occludin.³⁰⁵ Par conséquent, les auteurs ont montré que la présence de PCSK9 réduit l'infectivité du VHC dans le modèle cellulaire hépatique HuH7. Bien qu'ils observent une augmentation des niveaux de CD81 dans les hépatocytes de souris déficientes pour PCSK9 (*Pcsk9*^{-/-}) et ce, indépendamment de la présence du LDLR (*Pcsk9*^{-/-}/*ldlr*^{-/-}), la possible contribution conjointe entre CD81 et le LDLR en relation avec PCSK9 sur l'infectivité du VHC reste à être vérifiée. Néanmoins, cette étude suggère qu'un éventuel inhibiteur de PCSK9, pour contrer l'hypercholestérolémie, pourrait occasionner des effets secondaires

dont une plus grande infectivité par le VHC. À l'aide de souris hétérozygotes pour PCSK9 (*Pcsk9*^{+/-}; 50% de la protéine), il serait intéressant de connaître la sensibilité de ces hépatocytes au VHC. Ceci pourrait servir à titre indicatif quant à l'impact d'un éventuel inhibiteur de PCSK9 qui, utilisé à plus faible dose, pourrait être un bon compromis entre la réduction du LDL-cholestérol circulant et la sécurité des patients contre le VHC.

5.1.3 Hépatectomie partielle et diabète

Suite à une hépatectomie partielle, notre laboratoire a préalablement montré que l'expression de PCSK9 est augmentée au cours de la régénération hépatique.¹²⁶ L'absence de PCSK9 (souris *Pcsk9*^{-/-}) engendre des lésions importantes dans le foie en régénération, principalement dues au phénotype hypocholestérolémiant des souris *Pcsk9*^{-/-}.¹³⁹ En effet, l'action de PCSK9 sur la réduction des particules LDL peut être masquée par une diète riche en cholestérol où les lésions observées, suite à une hépatectomie partielle, peuvent être renversées.

Il fut démontré que les taux de particules LDL-cholestérol circulantes corrélés avec la présence des récepteurs de la famille du LDLR sur les cellules β du pancréas (responsable de la sécrétion de l'insuline) jouent un rôle dans le développement du diabète.^{306, 307} En effet, il est proposé qu'à forte concentration intracellulaire, les lipides causent un phénomène nommé « lipotoxicité » causant la mort par apoptose des cellules β , donc une baisse d'insuline plasmatique caractéristique du diabète. Puisque PCSK9 module les niveaux des récepteurs de la famille du LDLR (Chapitre II) et par conséquent les niveaux de LDL, il s'avère possible que PCSK9 soit impliquée dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète. Pour ce qui est de la corrélation entre PCSK9 et son potentiel impact sur le développement du diabète, deux études ont montrées des résultats contradictoires. Premièrement, un groupe a montré que la PCSK9 est plutôt exprimée dans les cellules δ du pancréas (responsable plutôt de la sécrétion de la somatostatine).³⁰⁸ Ensuite, il avance qu'en absence de PCSK9 (*Pcsk9*^{-/-}), les souris ne présentent aucune

différence quant au taux d'insuline dans le plasma, suggérant aucune évidence de diabète. D'un autre côté, notre laboratoire a observé que les souris *Pcsk9*^{-/-} possèdent une intolérance au glucose et des anomalies au niveau des cellules β du pancréas. Ces résultats opposés peuvent être expliqués notamment par l'origine des souris et la pureté du fond génétique. Il n'est pas encore évident que PCSK9 module les récepteurs de la famille du LDLR au niveau des cellules β . Aussi il faut mentionner que les souris *Pcsk9*^{-/-} sont hypocholestérolémique de manière constitutive, donc il est possible que l'effet lipotoxique causé par les particules LDL soit minoritaire et qu'une diète riche en cholestérol soit nécessaire pour bien distinguer l'effet de PCSK9 sur le pancréas. Malgré tout, l'impact réel de PCSK9 sur le développement du diabète reste à être démontré.

5.2 Voies du trafic cellulaire

Par des études de surexpression, il fut démontré que PCSK9 induit la dégradation du LDLR soit de manière intra- ou extracellulaire (*voir* Fig.11).^{140, 239} Il fut possible de distinguer ces deux voies principalement avec la participation ou non de la protéine cytosolique adaptatrice ARH, importante pour l'endocytose du LDLR (Chapitre I.1.5.3). En effet, la surexpression de PCSK9 dans le foie de souris déficientes pour l'ARH (*Arh*^{-/-}) régule à la baisse les niveaux du LDLR (voie intracellulaire). À l'inverse, PCSK9 n'induit pas la dégradation du LDLR lorsqu'incubée sur des hépatocytes *Arh*^{-/-} par voie extracellulaire. Ceci suggère que PCSK9 favorise la dégradation du LDLR soit de manière intra- (ARH-indépendante) ou extracellulaire (ARH-dépendante; Fig. 11). Bien que l'endocytose du LDLR soit sévèrement affecté en absence d'ARH dans les hépatocytes, on remarque aucune différence quant au niveau protéique du récepteur entre les souris de type sauvage et *Arh*^{-/-}.¹¹⁹ Il est donc possible que, de manière endogène, PCSK9 régule majoritairement le LDLR hépatique par la voie intracellulaire (ARH-indépendant). En supposant que PCSK9 agit par la voie extracellulaire, les niveaux protéiques du récepteur auraient dû augmenter (prévention de la dégradation extracellulaire du LDLR par PCSK9).

5.2.1 Voie extracellulaire

Dans l'article 2 (Chapitre III), nous nous sommes intéressé à la contribution endogène des voies intra- et extracellulaire dans la dégradation du LDLR par PCSK9. Pour ce faire, nous avons pris avantage des cellules HepG2 couramment utilisées comme modèle hépatocytaire humain notamment dû au fait qu'elles expriment de manière endogène plusieurs composantes nécessaire à la régulation du LDLR (*e.g.* LDLR, AP-2, ARH, PCSK9, etc.). Premièrement, nous avons évalué l'impact du blocage de l'endocytose générale sur les niveaux du LDLR. Il faut se rappeler que l'internalisation du LDLR, à partir de la surface membranaire, comporte plusieurs éléments dont l'incorporation du récepteur dans les vésicules de clathrine nécessitant la participation du complexe AP-2 et de la protéine adaptatrice ARH.^{118-122, 256, 263} Le bourgeonnement et le relâchement des vésicules de clathrine en formation requière la participation d'une enzyme nommée la Dynamine.^{255, 309, 310} En favorisant la fission membranaire, cette GTPase (lie et hydrolyse la guanosine triphosphate ; GTP) est responsable du relâchement des vésicules naissantes dans le cytosol. Récemment, une équipe a pu identifier, à partir d'une banque de 16 000 composés, une molécule capable d'inhiber spécifiquement l'activité enzymatique de la Dynamine.³¹¹ En effet, ils ont observé que l'ajout de la molécule « *Dynasore* » bloque l'endocytose de la transferrine, des particules LDL ainsi que la toxine cholérique. Suite au blocage efficace de l'endocytose dans les cellules HepG2 par le « *Dynasore* », nous n'avons dénoté aucun changement important quant aux niveaux protéiques du LDLR (Chapitre III, Fig. 1a-b). De manière plus spécifique, l'atténuation génique de l'ARH, importante pour l'endocytose du LDLR, n'a aussi pas affecté les taux du récepteur (Chapitre III, Fig. 1c-d). De manière encore plus exclusive, nous avons incubé les cellules avec le peptide EGF-AB dérivé du LDLR, responsable de la liaison de PCSK9 au récepteur.^{244, 245, 267} Bien qu'il fut possible de contrer l'action de 200 nM de PCSK9 (~50X la concentration endogène) sur la dégradation du LDLR avec 12.5 µM du peptide

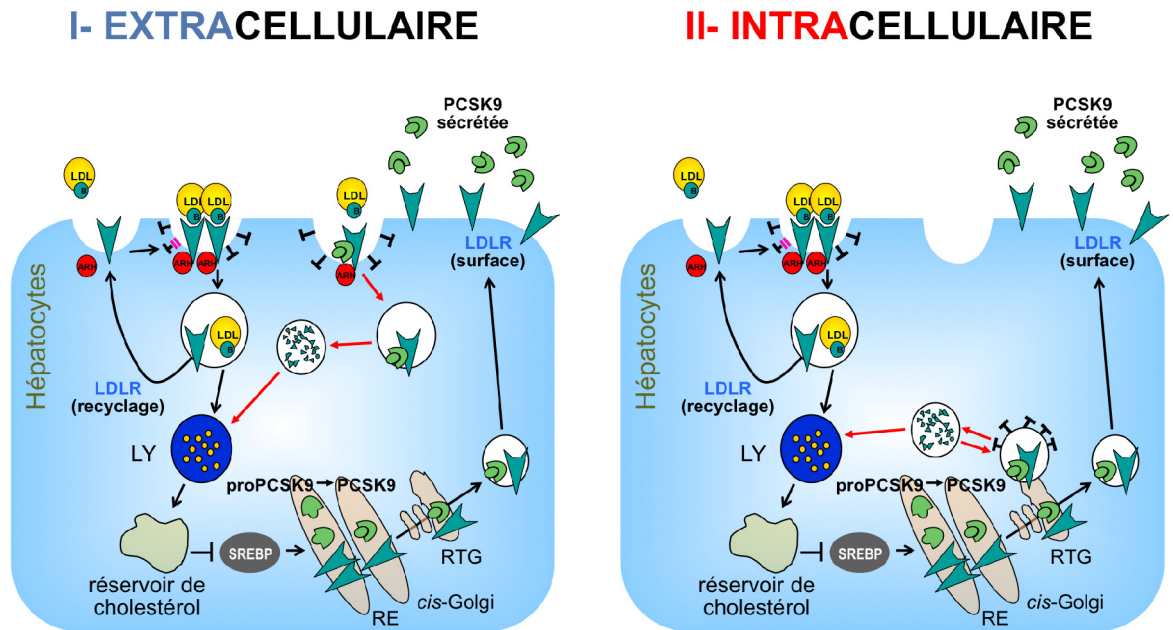


Figure 11 Modèle des voies du trafic cellulaire (intra vs extra) impliquées dans l'induction de la dégradation du LDLR par PCSK9. **I-EXTRACELLULAIRE** – ce modèle (ARH-dépendant) propose que la PCSK9 sécrétée dans l'espace extracellulaire lie le LDLR à la surface des hépatocytes. Une fois le complexe retrouvé dans les endosomes, PCSK9 prévient le recyclage constitutif du récepteur et le redirige vers les endosomes tardifs/lysosomes (ET/L) pour être ensuite dégradé. **II-INTRACELLULAIRE** – ce modèle propose plutôt que dans la voie de sécrétion constitutive PCSK9 agirait au niveau du réseau *trans*-golgien (RTG) pour rediriger le LDLR vers les ET/L où il sera dégradé. Jusqu'à présent, on ne sait pas si cette voie (trafic direct entre le RTG et les ET/L) se fait avec la participation du LDLR ou non. LDLR, *low-density lipoprotein receptor*; LDL, *low-density lipoprotein*; ARH, *autosomal recessive hypercholesterolemia*; RE, réticulum endoplasmique; RTG, réseau *trans*-Golgien; LY, lysosomes; SREBP, *sterol regulatory element binding protein*. Les schémas illustrent aussi l'interrelation entre le recyclage constitutif du LDLR et la relâche du LDL-cholestérol dans les ET/LY qui contribue au cholestérol cellulaire dans le RE, la régulation des SREBPs par conséquent du LDLR et PCSK9 ainsi que son autoactivation dans le RE (voir Chapitre I.1.3 et I.1.6). Les voies respectives sont illustrées à l'aide de flèches rouge. Les vésicules de clathrine (barres perpendiculaires noires) et la dynamine (barres parallèles roses) sont aussi représentées.

EGF-AB, à cette même concentration, aucun effet majeur ne fut observé sur l'activité et les niveaux du LDLR à des concentrations endogènes de PCSK9 (Chapitre III, Fig. 2). Ces résultats suggèrent que le ratio de dégradation du LDLR est maintenu (possiblement par une voie intracellulaire) malgré la présence ou non de PCSK9 endogène ou d'inhibiteur compétitif (EGF-AB) dans l'espace extracellulaire. À l'aide d'hépatocytes primaires de souris de type sauvage, nous avons aussi observé que la concentration endogène sécrétée de PCSK9 n'a pas d'impact sur la dégradation intracellulaire du LDLR, lorsqu'incubée sur des hépatocytes dérivés de souris déficientes pour la PCSK9 (*Pcsk9*^{-/-}; Chapitre III, Fig. 3).

5.2.2 Effet local de PCSK9 sur la dégradation du LDLR

À l'aide du plasmide bicistronique « *pIRES* », nous avons ensuite évalué la portée de l'activité de PCSK9 sur la dégradation du LDLR. Ce vecteur d'ADN permet d'encoder indépendamment les protéines PCSK9 ainsi que le rapporteur EGFP (*enhanced green fluorescent protein*).¹²⁶ Les chercheurs Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien ont reçu le prix Nobel de Chimie en 2008 pour avoir isolé et caractérisé une protéine capable d'émettre une fluorescence verte (GFP; *green fluorescent protein*) à partir de la méduse *Aequorea victoria*. Cette découverte est maintenant un outil de visualisation indispensable pour la biologie cellulaire actuelle.^{17, 312} Nous avons d'abord remarqué que la surexpression de PCSK9 dans les cellules HepG2 réduit les niveaux du LDLR localement sans conséquence évidente sur les cellules voisines (illustré par les cellules GFP-positives, GFP⁺; Chapitre III, Fig. 4a). Pour définir davantage l'action de PCSK9, nous avons trié les cellules en fonction de la présence de PCSK9 (GFP-positives ; GFP⁺) et du LDLR présent à la surface (Chapitre III, Fig. 4b, S2, et S3). Comme observé par immunocytochimie, nous avons dénoté que la présence de PCSK9 (dans les cellules HepG2 et HEK293) réduit le LDLR sur les transfectants sans toutefois affecter les niveaux du récepteur sur les cellules avoisinantes. Contrairement à la forme sauvage, nous avons observé par contre que le mutant « *gain-de-fonction* » PCSK9-D374Y peut affecter aussi le LDLR sur les cellules

adjacentes. Puisqu'il est bien documenté que cette mutation confère à PCSK9 une capacité accrue de liaison du LDLR à pH neutre, ceci peut donc expliquer le *gain-de-fonction* par une action « *paracrine* » du mutant naturel D374Y sur la dégradation accrue du LDLR, causant ainsi une plus grande influence sur les taux de LDL-cholestérol circulant.

5.2.3 Voie intracellulaire

Finalement, nous avons examiné la contribution de la voie intracellulaire (réseau *trans*-golgien vers les endosomes tardifs/lysosomes ; RTG vers ET/L) sur la dégradation du LDLR par PCSK9 (Chapitre III, Fig. 5). Dans notre laboratoire, nous avons préalablement observé que la chaîne lourde de clathrine (CHC) est essentielle à la dégradation du récepteur par PCSK9.¹⁷⁸ Comme le trafic vésiculaire intra- et extracellulaire nécessite principalement la présence de la chaîne lourde de la clathrine (pour l'endocytose et le transport du RTG vers les ET/L), il est donc difficile de distinguer les deux voies importantes dans la dégradation du LDLR par PCSK9. Par interférence à l'ARN, une étude récente a démontré que l'atténuation des chaînes légères de clathrine (CLCs ; CLC isoformes a et b) engendre une interruption spécifique du trafic vésiculaire intracellulaire sans toutefois moduler l'endocytose clathrine-dépendante.³¹³ Les CLCs font parties intégrales de la structure en « panier » typique des vésicules de clathrine. Elles furent récemment associées à la protéine H1PR (*Huntingtin-interacting protein 1 related*) impliquée dans la liaison à l'actine lors du transport vésiculaire entre le RTG et les ET/L.^{255, 314-320} Dans les cellules HepG2, nous avons d'abord confirmé que l'atténuation génique des CLCs n'affecte pas l'endocytose du LDLR (internalisation de Dil-LDL) et qu'il y a une relocalisation du CI-MPR (*cation-independant mannose-6-phosphate receptor* ; regroupement dans des compartiments intermédiaires entre RTG et ET/L) typique de l'interruption de la voie de trafic intracellulaire (Chapitre III, Fig. 5a et S4). Par immunobuvardage et immunocytochimie, nous avons dénoté que les niveaux endogènes du LDLR sont fortement augmentés suite à l'atténuation génique des CLCs et ce, de manière PCSK9-dépendante (Chapitre III, Fig. 5b-f et S4). Ceci suggère que l'intégrité de la voie de

trafic intracellulaire est importante pour l'induction de la dégradation du LDLR par PCSK9. Comparable à l'atténuation génique de PCSK9, nous avons aussi remarqué que la réduction des CLCs masque la sensibilité du LDLR à la présence de chlorure d'ammonium (NH_4Cl ; agent neutralisant du pH des ET/L bloquant l'action de PCSK9 sur le LDLR ; Fig. 12)²²⁵ prévenant possiblement l'incorporation direct ou indirecte du LDLR et/ou de PCSK9 dans les compartiments acides (ET/L) responsable de la dégradation du récepteur par PCSK9.

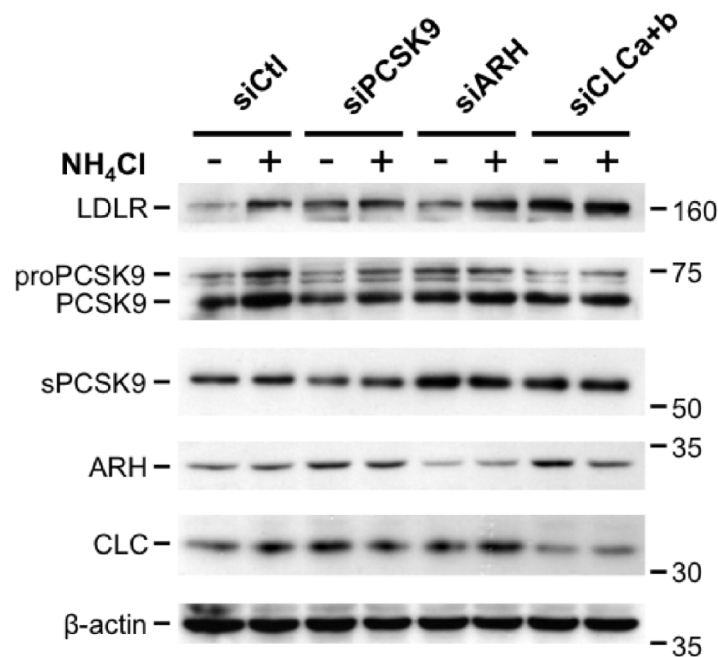


Figure 12 **Corrélation entre l'atténuation génique des composants du trafic cellulaire et l'effet du chlorure d'ammonium sur les niveaux du LDLR.** Les cellules HepG2 furent transfectées avec des ARN interférants spécifiques (siCTL, contrôle ; siPCSK9 ; siARH et siCLC_{a+b}). 48h après la transfection, les cellules changées de milieu et incubées (+) ou non (-) avec du chlorure d'ammonium (NH_4Cl) pour 24h. Ensuite, les protéines furent analysées par immunobuvardage où sPCSK9 correspond à la PCSK9 sécrétée dans le milieu extracellulaire. Le niveau de la protéine β-actine fut utilisé comme normalisateur.

En comparant les cellules HepG2 traitées ou non avec un ARN interférant pour les CLCs en présence de milieu pauvre en lipoprotéines (LPDS ; *lipoprotein-deficient serum*), nous avons observé une synergie entre la transcription (SREBP-dépendante ; Chapitre

I.1.3) et l'interruption du trafic intracellulaire sur l'augmentation des niveaux du LDLR (Chapitre III, Fig. 6). En somme, cet article propose que de manière endogène, la voie intracellulaire joue un rôle important dans l'induction de la dégradation du LDLR par PCSK9 dans le modèle hépatique HepG2 (*voir* Fig. 11).

Une étude a démontré que la surabondance de PCSK9 dans le plasma induit la dégradation du LDLR dans les hépatocytes. En effet, lorsque des souris de type sauvage furent interconnectées de manière à partager leurs circulations sanguines (parabiose) avec des souris surexprimant PCSK9, les niveaux hépatiques du LDLR dans les souris réceptives furent grandement diminués, résultant en une augmentation du taux de LDL-cholestérol circulant.²³⁹ Il fut aussi proposé que la présence du LDLR contribue grandement à la clairance plasmatique de PCSK9 dans le foie.²⁹⁷ Nous avons remarqué que l'absence de LDLR (*ldlr*^{-/-}) augmente de manière considérable la concentration de PCSK9 dans le plasma de souris (Chapitre III, Fig. S1). Par contre, aucune différence ne fut observée quant aux niveaux du LDLR et des particules LDL lors de parabiose entre souris de type sauvage et *ldlr*^{-/-}.²³⁹ Il est donc possible qu'en état de surabondance ou dans le cas de mutations naturelles (*e.g.* D374Y) PCSK9 déplace un équilibre favorisant la dégradation du LDLR de manière extracellulaire. Il est aussi possible que dans le foie, contrairement aux cellules en cultures (HepG2 ou hépatocytes primaires), l'existence d'une structure plus complexe et tridimensionnelle provoque une concentration locale de PCSK9 menant à un seuil où elle peut agir de manière extracellulaire. Dans le foie, il existe l'espace de Disse qui est une interface entre les sinusoides (vaisseaux sanguins fenestrés) et les hépatocytes.³²¹ Une fois sécrétée par les hépatocytes, il est donc possible que PCSK9 s'y accumule, atteignant le seuil nécessaire pour agir sur la dégradation du LDLR ne reflétant pas la concentration mesurée dans le plasma.

Il fut récemment proposé que le blocage de PCSK9, par l'injection intraveineuse d'un anticorps monoclonal (mAb1) dirigé contre la surface du domaine catalytique de PCSK9 (responsable du site de liaison au LDLR), provoque une hausse des niveaux

hépatiques du récepteur corrélée avec une clairance augmentée des particules LDL circulantes.²⁶⁶ Bien que la portion Fab (*fragment antigen binding*) de l'anticorps mAb1 dirigée contre PCSK9 fût caractérisée pour sa capacité à interférer avec la liaison de PCSK9 au LDLR, on remarque que le complexe PCSK9•mAb1 couvre partiellement le domaine d'interaction PCSK9•EGF-A (Fig. 13). Jusqu'à présent, il n'y a aucune contre-évidence que le complexe PCSK9•mAb1 ne soit pas internalisé dans la cellule. Il est donc possible que PCSK9 et le mAb1 parviennent à être endocytées par un autre récepteur impliquant possiblement le domaine CHRD et que l'incorporation d'anticorps dans les endosomes tardifs pourrait avoir un impact majeur sur la dégradation du LDLR par PCSK9 soit par la voie extra- et/ou intracellulaire. En effet, il fut récemment rapporté que l'utilisation d'un anticorps dirigé, cette fois-ci contre le domaine C-terminal (CHRD) et n'interférant pas avec la liaison à l'EGF-A, bloque l'internalisation de PCSK9 et aussi son action sur la dégradation du LDLR.¹⁷⁵

Afin de bien cerner les composantes du trafic cellulaire et leurs implications dans la dégradation du LDLR induite par PCSK9, il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'absence hépatique de CLCs sur la dégradation du LDLR. Aussi, il serait possible de générer des souris doublement déficientes pour les gènes PCSK9 et ARH, afin de déterminer la contribution endogène de la voie intracellulaire. Dans l'article II (Chapitre III), nous avons démontré que l'atténuation génique des CLCs prévient l'induction de la dégradation du LDLR par PCSK9. Nous avons aussi montré que l'absence de CLCs n'influence pas la capacité de PCSK9 à diminuer le LDLR, lorsque ajoutée en excès dans l'espace extracellulaire (Chapitre III, Fig. 5e). Ceci suggère que la machinerie impliquée dans la dégradation du LDLR par PCSK9 n'est pas altérée en absence de CLCs (*e.g.* transport de protéases résidentes).

Jusqu'à maintenant, il est difficile de prédire si l'interruption du trafic intracellulaire affecte le transport de PCSK9, du LDLR ou du complexe PCSK9•LDLR. À titre d'exemple, le taux de sécrétion de l'apolipoprotéine B (apoB; ligand du LDLR)

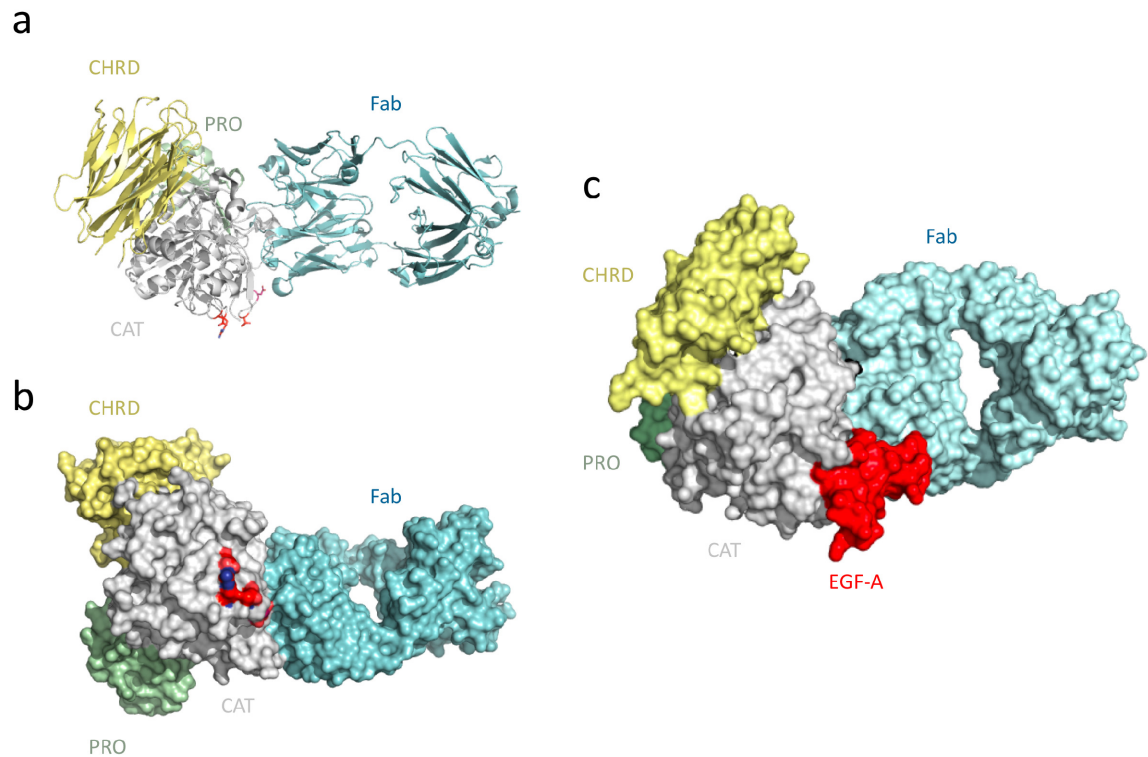


Figure 13 **Domaine d'interaction de l'anticorps mAb1 (portion Fab) à PCSK9.** (a) structure du complexe PCSK9•mAb1 sous forme « *ruban* ». (b) structure du complexe PCSK9•mAb1 sous forme « *surface* ». (c) superposition de structures des complexes PCSK9•EGF-A et PCSK9•mAb1 sous forme « *surface* ». (Fab ; *fragment antigen binding*, CHRD ; domaine riches en cystéine et histidine, PRO ; prorégion ; CAT ; domaine catalytique). Les résidues impliqués dans l'interaction avec PCSK9•EGF-A sont illustrés dans le domaine catalytique (CAT) de PCSK9 pour a et b. Structures déterminées à l'aide de MacPymol (PDB 3H42 et 3BPS).²⁶⁶

dans des hépatocytes primaires de type sauvage dépend grandement de la présence du LDLR intracellulaire.²²⁹ Il fut remarqué qu'en présence du récepteur, l'apoB est dégradée dans un compartiment situé après le réticulum endoplasmique possiblement les endosomes tardifs/lysosomes (ET/L). Il est donc possible d'imaginer que le LDLR puisse voyager directement du réseau *trans*-golgien (RTG) aux ET/L complexé ou non avec l'apoB. Comme pour l'apoB, nous avons aussi remarqué que l'absence de LDLR (souris *ldlr*^{-/-})

résulte en une plus grande concentration de PCSK9 dans la circulation sanguine. Ceci peut être expliqué soit par une réduction de la clairance hépatique ou par une à baisse de la dégradation intracellulaire de PCSK9 par le LDLR dans les ET/T apparenté à l'interrelation LDLR•apoB. Bien que controversé sur l'effet du cholestérol plasmatique, il fut récemment proposé que la sortiline (*Sort1*, locus identifié par association génétique lié à une hausse des niveaux de LDL-cholestérol ; Chapitre I.1.5.6), impliquée dans le transport de cargo entre le RTG et les ET/L, joue aussi un rôle dans la dégradation intracellulaire de l'apoB lors d'un triage au niveau du RTG vers les ET/L.^{322, 323} À l'aide de souris de type sauvage et déficientes pour la Sortiline (*Sort1*^{-/-} ; généreusement offertes par le Dr. Morales, McGill), nous avons simultanément étudié (d'autres équipes indépendantes) la possible fonction de ce locus de l'hypercholestérolémie sur le ciblage de PCSK9 dans les ET/L. Nous avons d'abord vérifié par PCR en temps réel, que la transcription de gènes cholestérogéniques n'est pas affectée en absence de Sortiline (Fig. 20a ; Annexe 4). Par immunobuvardage et immunohistochimie, nous avons ensuite observé une légère l'augmentation des niveaux protéique du LDLR hépatique et une baisse des taux de PCSK9 plasmatique en absence de sortiline (Fig. 20b-d ; Annexe 4). Par contre, aucune différence significative ne fut observée quant aux taux de cholestérol totaux ainsi que les profils lipidiques analysés par HPLC (*high-performance liquid chromatography*; Fig. 20e et f ; Annexe 4). Nos résultats sont en contradiction avec les récentes études controversées qui démontrent soit une augmentation ou diminution de particules LDL-cholestérol en absence de Sortiline.^{322, 323} Contrairement à nos observations réalisées sous une diète normale, il est important de noter que ces analyses furent réalisées sur des souris sous une diète riche en lipides pouvant possiblement expliquer les différences observées. Bien qu'il semble que la sortiline lie l'apoB (ligand du LDLR) et module ainsi ces niveaux plasmatiques, il est possible que l'augmentation des niveaux du LDLR (nos résultats) soit balancée par une hyperapobetalipoproteinemia (hausse d'apoB dans le plasma) de manière à ne pas affecter les profils lipidiques. Chose certaine, la sortiline ne semble pas jouer un rôle dans le trafic et la régulation de PCSK9 dans les hépatocytes. Similaire aux triages sélectif observé pour les complexes

LDLR•apoB et Sort1•apoB, il est donc possible que PCSK9 provoque une redirection du trafic intracellulaire du LDLR directement du RTG vers les ET/L, complexé ou non à l'apoB.

Comme nous avons observé dans l'article II, l'atténuation de la voie extracellulaire (ARN interférant avec l'ARH) ne modifie pas les niveaux du LDLR tandis que l'interruption du trafic intracellulaire (ARN interférant avec les CLCs) engendre une baisse de la dégradation du récepteur par PCSK9. Il est aussi possible, que le système en place possède une certaine plasticité favorisant un équilibre entre les voies extra- et intracellulaire. Est-ce que la réduction de l'endocytose du LDLR favorise un accroissement de la dégradation intracellulaire par PCSK9 ? Il serait possible d'étudier la dynamique entre le trafic cellulaire et la dégradation du LDLR par PCSK9 en utilisant une approche récente nommée CALI (*chromophore-assisted light inactivation*).^{324, 325} Comparativement à une atténuation génique (interférence à l'ARN) où il y a risque d'adaptation artificielle de la cellule dû aux longues périodes de traitement, cette technique permet d'inactiver un gène spontanément selon un espace-temps donné et pour une durée prédéterminée.

Il est donc évident que l'approfondissement du trafic et de la dynamique du LDLR, de PCSK9 et du complexe PCSK9•LDLR est de tout intérêt pour bien cerner les étapes impliquées dans la dégradation du LDLR par PCSK9. Un autre scénario possible pourrait être dicté par la rencontre de PCSK9 et du LDLR de manière indépendante dans un espace commun, tels les endosomes ou les corps multivésiculaires (MVB). Il serait donc très pertinent d'étudier le trafic de PCSK9 et son interdépendance avec le LDLR à l'aide des technologies de type FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) ou FLIM (*fluorescence lifetime imaging microscopy*).³²⁶ Ces approches permettent de visualiser le comportement de deux protéines et/ou de la formation d'un complexe en temps réel à l'aide de fluorophores analysés par microscopie confocale.

5.2.4 PCSK9 et l'ubiquitination du LDLR

La monoubiquitination est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout de la protéine ubiquitine à une chaîne peptidique donnée qui provoque généralement une dégradation de la protéine dans un contexte bien précis (Chapitre I.1.6.5.3). Il est maintenant reconnu que la monoubiquitination de queues cytosoliques soit un signal important pour l'endocytose, le trafic et la dégradation de protéines transmembranaires dans les lysosomes (*e.g.* récepteurs à activité tyrosine kinase).³²⁷⁻³²⁹ Afin d'approfondir et d'identifier le mécanisme par lequel PCSK9 induit la dégradation du LDLR, nous avons étudié la relation entre l'ubiquitination du récepteur et PCSK9. Pour ce faire, nous avons pris avantage du plasmide codant pour l'ubiquitine fusionnée à l'étiquette HA (hémagglutinine d'influenza-ubiquitine, HA-Ub; généreusement offert par le Dr. Gratton, IRCM).^{330, 331} Nous avons donc transfecté l'HA-Ub dans les cellules HepG2 en y ajoutant ou non 2µg/ml de PCSK9 purifiée. Ensuite, le LDLR fut immunoprécipité spécifiquement et révélé par immunobuvardage ainsi que les niveaux d'ubiquitination du récepteur à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'étiquette HA (Fig. 14). Nous avons d'abord vérifié que la transfection du plasmide HA-Ub provoque bien une ubiquitination générale des protéines (*vector vs HA-Ub*) et que les niveaux du LDLR furent diminués en présence de PCSK9 (INPUT, Fig.14b). Les cellules furent également incubées avec ou sans PCSK9 conjointement avec du chlorure d'ammonium (+NH₄Cl) afin de prévenir la dégradation du LDLR par PCSK9 dans les lysosomes pouvant possiblement concentrer davantage les taux d'ubiquitination du récepteur et d'évaluer le potentiel rôle modulateur de PCSK9 dans cette modification post-traductionnelle.^{225, 248} Suite à l'immunoprécipitation du récepteur, on remarque que la présence de PCSK9 extracellulaire n'affecte pas le taux d'ubiquitination du LDLR avec ou sans chlorure d'ammonium (HA; Fig. 14a). Une étude a confirmé indirectement nos résultats en montrant que la queue cytosolique du LDLR n'est pas majoritairement responsable de l'effet de PCSK9 sur la dégradation du récepteur.^{253, 254}

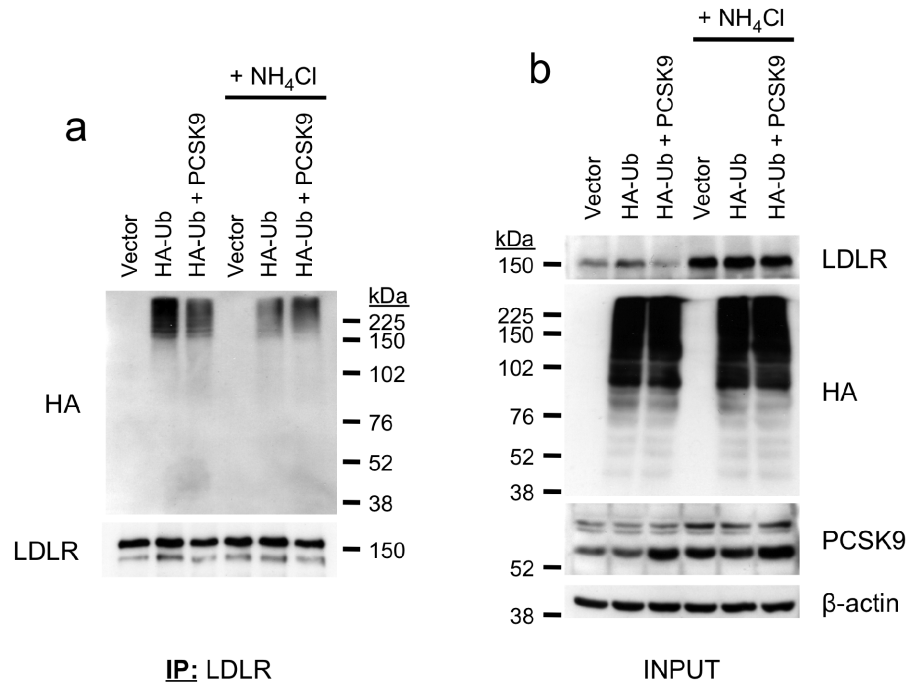


Figure 14 PCSK9 n'affecte pas le taux d'ubiquitination du LDLR. Les cellules HepG2 furent transfectées avec un plasmide codant pour l'ubiquitine contenant l'étiquette HA (hémagglutinine; HA-tag).³³⁰ 24h post-transfection les cellules furent incubées en absence ou présence de 2µg/ml PCSK9 humaine purifiée exogène (+PCSK9) avec ou sans chlorure d'ammonium (+NH₄Cl). **(a)** Après 16h d'incubation, les extraits protéiques furent soumis à une immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre le LDLR. L'immunoprécipitat fut ensuite analysé par électrophorèse à l'aide d'un anticorps spécifique pour l'étiquette HA et le LDLR. **(b)** Une fraction de l'extrait protéique (avant immunoprécipitation; *INPUT*) fut aussi soumise à une électrophorèse et révélée avec les anticorps HA, LDLR, PCSK9 et β-actine.

Cette expérience nous permet donc d'éliminer la possibilité que PCSK9 favorise l'ubiquitination du LDLR comme mécanisme impliquée dans l'induction de la dégradation du récepteur. Par contre, il reste à démontrer si la PCSK9 intracellulaire peut moduler l'état d'ubiquitination du LDLR favorisant ainsi son trafic du RTG vers les ET/L.

Une étude récente, publiée dans la revue *Science*, a proposé qu'une E3-ligase spécifique (*Idol*, *inducible degrader of the LDLR*) puisse ubiquitinyler la queue cytosolique

du LDLR induisant ainsi une dégradation intracellulaire du récepteur, possiblement dans les lysosomes.³³² Il fut ensuite dénoté que certains membres de la famille du LDLR, soit les récepteurs ApoER2 et VLDLR, soient aussi dégradés par l'ajout d'ubiquitine catalysé par *Idol*.³³³ Cette nouvelle voie de dégradation par ubiquitination des membres de la famille du LDLR serait plutôt un contrôle extra-hépatique qui, comme observé à la Figure 14, ne semble pas nécessiter la présence de PCSK9.³³³ Il reste donc à démontrer si PCSK9 et *Idol* peuvent agir de concert dans la régulation intra- ou extracellulaire des membres de la famille du LDLR (Chapitre II et III).

5.3 PCSK9 et Annexine A2 (AnxA2)

5.3.1 Identification d'un inhibiteur naturel pour PCSK9

Dans l'article 3 (Chapitre IV), nous avons mené une série d'expériences visant à identifier des partenaires protéiques pouvant interagir avec PCSK9. Par immunobuvardage d'affinité, nous avons d'abord remarqué que le domaine C-terminal (CHRD) de PCSK9 interagit fortement et spécifiquement avec une protéine ~33 kDa présente dans les cellules COS-1, CHO-K1, HuH7, BSC40 (Chapitre IV, Fig. 1). Par coimmunoprécipitation suivi d'une analyse par spectrométrie de masse, nous avons ensuite pu identifier cette protéine comme étant l'Annexine A2 (AnxA2 ; Chapitre IV, Fig. 2 et 3). L'AnxA2 contient une courte portion N-terminale (Ser²-Asn³²) suivi du reste de la molécule qui compose ~90% de la molécule (Phe³³-Asp³³⁹).²⁷⁴ Bien qu'elle soit présente dans le cytosol, l'AnxA2 peut être transloquée à la surface membranaire des cellules endothéliales où elle joue un rôle dans le rassemblement du plasminogène (précurseur de la plasmine) et du tPA (activateur tissulaire du plasminogène) important pour la fibrinolyse par la plasmine dans la circulation sanguine.^{334, 335} Par immunocytochimie, nous avons observé que PCSK9 colocalise à la surface externe membranaire avec l'AnxA2 dans les cellules CHO-K1 (Chapitre IV, Fig. 5). Ensuite, nous avons remarqué que la présence d'AnxA2 réduit la capacité de PCSK9 à

induire la dégradation du LDLR (Chapitre IV, Fig. 6-8). Aussi, l'ajout d'AnxA2 dans le milieu extracellulaire réduit considérablement la liaison de PCSK9 au LDLR à la surface des cellules. Nous avons montré que la présence de l'AnxA2 dans les cellules HepG2, qui expriment de manière endogène PCSK9, provoque une hausse des niveaux de LDLR et inhibe aussi l'effet de la surexpression de PCSK9 sur la dégradation du récepteur. Par interférence à l'ARN, l'atténuation génique de l'AnxA2 provoque une réduction des niveaux du LDLR dans les cellules HuH7 (expriment PCSK9 et l'AnxA2 de manière endogène). En somme, ces résultats suggèrent fortement que l'AnxA2 est un inhibiteur naturel de PCSK9 quant à son action sur le LDLR.

5.3.2 Cartographie de l'interaction PCSK9•AnxA2

Dans l'article 3, nous avons mis en évidence que PCSK9 lie spécifiquement et directement l'AnxA2, et non l'AnxA1 (Chapitre IV, Fig. 3). Par alignement de séquences, on remarque que chez l'humain, les résidues de l'AnxA2 sont conservés à ~72% avec l'AnxA1 qui est identique à 98% avec son correspondant bovin. En comparant les structures cristallographiques de l'AnxA1 (bovine) et de l'AnxA2 (humaine ; Fig. 15), on remarque qu'elles partagent essentiellement la même architecture tertiaire. La signature de la liaison de PCSK9 à l'AnxA2 doit principalement reposer sur les chaînes latérales présentes à la surface des hélices alpha (Fig. 15). Bien que les régions N-terminales des Annexines aient des rôles respectifs, dictés par des séquences peptidiques variables, nous avons démontré par mutagenèse dirigées, que le retrait des résidues 2 à 24 n'affecte pas la liaison de PCSK9 à l'AnxA2 (Chapitre IV, Fig. 9). Nous avons ensuite entrepris d'identifier le domaine important pour l'interaction spécifique de PCSK9 à l'AnxA2. En retirant séquentiellement les différents domaines ($\Delta R1$, 37-108 ; $\Delta R2$, 109-192 ; $\Delta R3$, 193-268 ; $\Delta R4$, 269-339), nous avons remarqué que les acides aminés 37-108 (domaine R1) sont critiques pour la liaison de PCSK9 à l'AnxA2 déterminée par immunobuvardage d'affinité (Chapitre IV, Fig. 9).

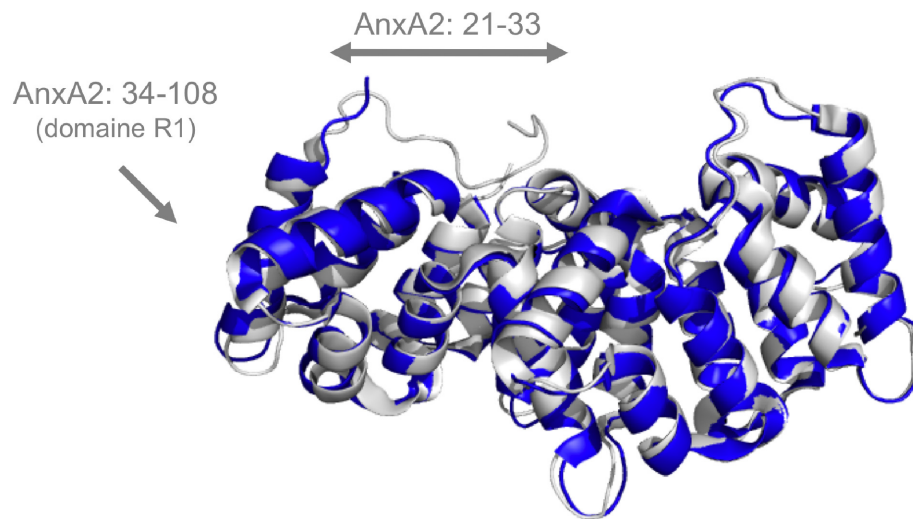


Figure 15 Superposition des structures Annexine A1 et A2. La structure bovine d'Annexine A1 (bleu ; PDB 1MCX) et humaine d'Annexine A2 (gris ; PDB 1W7B) furent superposées et déterminées à l'aide de MacPymol. La séquence variable (aa 21 à 33) et le domaine R1 (aa 34 à 108) sont représentés.

De manière plus spécifique, nous avons ensuite comparé les séquences primaires des domaines R1 de l'AnxA1 et AnxA2 afin de déterminer les résidus indispensables pour la spécificité de l'AnxA2 envers PCSK9 (Chapitre IV, Fig. 9 et 21, Annexe 5). De nombreuses constructions d'ADN furent donc générées où notamment les résidues du domaine R1 de l'AnxA1 furent interchangeés avec les acides aminés correspondants dans l'AnxA2. On remarque que l'information requise pour la liaison de PCSK9 à l'AnxA2 débute avec l'acide aspartique en position 34 (D34) et se termine avec une glutamine à la position 108 (Q108) coïncidant exactement avec l'apparition de la première hélice alpha de l'AnxA2 (Fig. 16 et 21, Annexe 5). Les résidus chargés exposés à l'extérieur des hélices alpha de l'AnxA2 sont aussi importantes pour la liaison à PCSK9. En effet, l'alignement et le positionnement des de certains résidus clés est essentiel pour l'interaction PCSK9•AnxA2 (D34, E36, R37, K47, N58, S64, R77, R78, K81 et K88 ; Fig. 16 et 21,

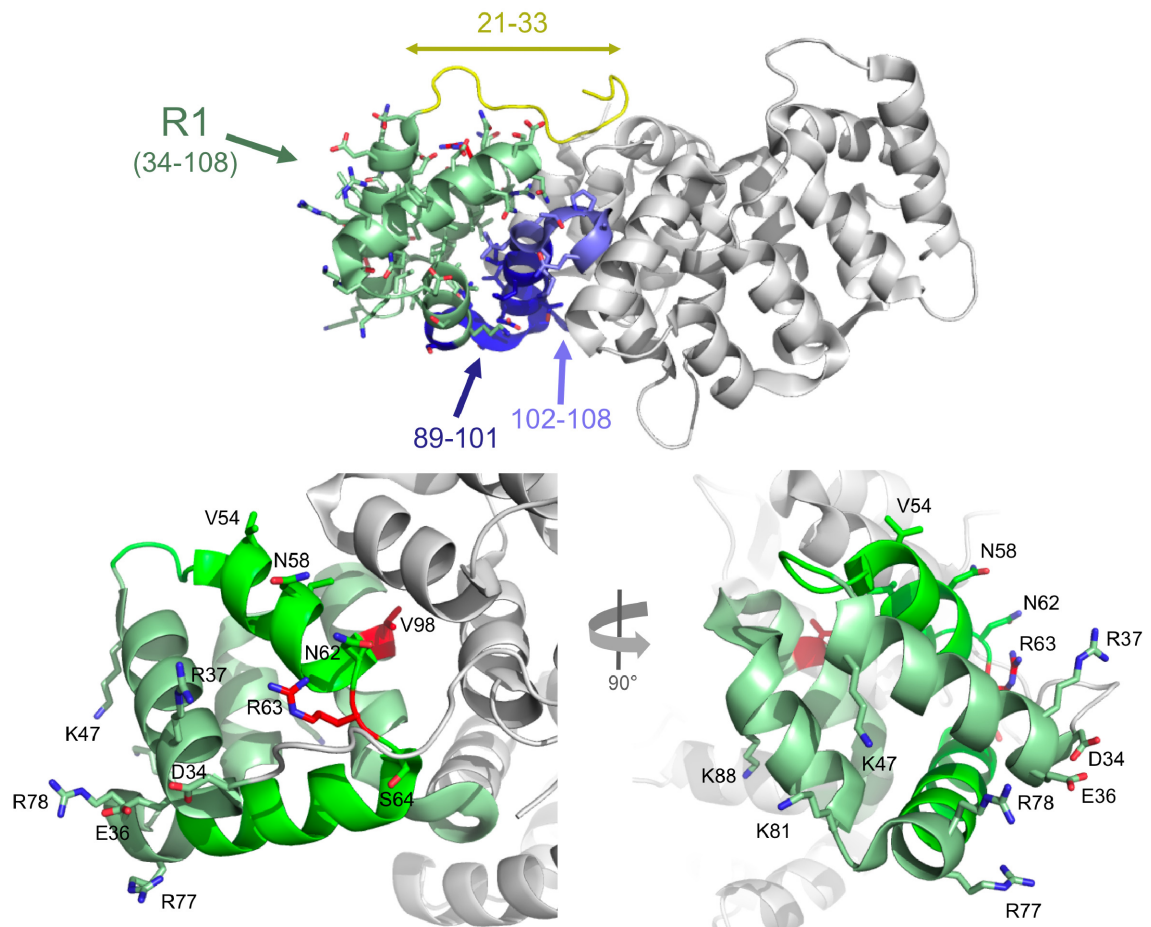


Figure 16 Signature des résidus essentiels pour la liaison de PCSK9 à l'AnxA2. À partir de la structure de type « *ruban* » de l'AnxA2 (PDB 1W7B), déterminée à l'aide de MacPymol, les acides aminés importants dans la liaison de PCSK9 à l'AnxA2 sont illustrés (basé sur les résultats d'immunobuvardage d'affinité ; Annexe 4). Le domaine R1 (acides aminés 34-108) et les chaînes latérales sont illustrées dans le panneau du haut. Les séquences 89-101 (bleu foncé) et 102-108 (magenta) essentielles sont aussi montrées. Dans les panneaux du bas, les chaînes latérales des résidus importants dans le domaine R1 (34-108) pour la spécificité de la liaison de PCSK9 à l'anxA2 et les hélices (vert foncé) sont aussi illustrées. Les résidus chargés positivement sont représentés en bleu et négativement en rouge. Les résidus impliqués dans les polymorphismes (SNPs ; single nucléotide polymorphismes) connus dans le domaine R1 sont représentés en rouge (R63S et V98L).

Annexe 5). Le retrait ou l'échange des régions fortement conservées entre l'AnxA1 et l'AnxA2 prévient aussi la liaison de PCSK9 à l'AnxA2 (49-61, 62-75, 89-101 et 102-108 ; Fig. 16 et 21, Annexe 5). Il est donc possible d'imaginer que la signature de l'interaction PCSK9•AnxA2 nécessite la formation d'une structure tertiaire propre à l'AnxA2, fort possiblement dictée par les liaisons intramoléculaires des résidus chargés présents. En effet, on remarque que l'orientation des résidus critiques propose donc une surface d'interaction propre à l'AnxA2. Plus précisément, le domaine R1 (résidus 34 à 108) est composé d'hélices alpha repliées sur elles-mêmes de manière à aligner les résidus chargés en N-terminal avec et C-terminale (Fig. 16 et 21, Annexe 5). Il serait donc très intéressant de produire une forme courte de l'AnxA2 où seulement les résidus présents dans le plan, dicté par les résidus chargés critiques, pourrait être directement fusionné de manière à préserver l'intégrité, la nature et l'orientation des hélices alpha sans toutefois nécessiter la pleine longueur du domaine R1.

Nous avons ensuite eu l'idée de générer une version artificielle du domaine R1 de l'AnxA2, où nous avons ajouté en N-terminal le peptide signal de PCSK9 (pour permettre sa localisation dans la voie sécrétoire) et en C-terminal l'étiquette HA et le peptide KDEL (important pour la rétention de protéines dans la lumière du réticulum endoplasmique ; RE). L'idée étant d'avoir un essai fonctionnel visant à mesurer l'activité de différentes variations du domaine R1 en mesurant la rétention de PCSK9 (dans le RE par le peptide SP-R1-HA-KDEL) qui est normalement rapidement sécrétée. Nous avons d'abord vérifié que l'ajout du peptide signal et KDEL provoque bel et bien une localisation du domaine R1 dans le RE contrairement à sa présence constitutive dans le cytosol. Contrairement à la forme soluble et cytoplasmique, la présence du domaine R1 dans le RE (SP-R1-HA-KDEL) les cellules HEK293 réduit considérablement la sécrétion de PCSK9 dans l'espace extracellulaire (Fig. 22, Annexe 6). L'effet de rétention fut d'autant plus marqué pour le domaine CHRD seul comparativement à la forme complète de PCSK9, possiblement dû à un délai de transit augmenté. Nous avons aussi remarqué que le domaine R1 de l'AnxA1 (SP-R1(AnxA1)-

HA-KDEL), qui ne lie pas PCSK9 soit par immunobuvardage d'affinité ou co-immunoprécipitation (Chapitre IV), peut aussi interagir avec PCSK9. Il est donc possible qu'en condition de surabondance, la présence surchargée des peptides R1 (AnxA1 et A2) dans le RE provoque un engorgement plus ou moins spécifique résultant en une baisse de la sécrétion de PCSK9. Cette approche de criblage nécessite davantage de raffinement afin d'être utilisée à grande échelle (*e.g.* différents modèles cellulaires, plasmides d'expressions, temps, concentrations, *etc.*). Par contre, en collaboration avec la compagnie pharmaceutique *Bristol-Myers Squibb*, nous avons pu montrer qu'un peptide synthétique dérivé du domaine R1 de l'AnxA2 (et non le mutant ⁷⁷AATAA) est capable d'inhiber la liaison de PCSK9 au LDLR *in vitro* avec un IC₅₀ ~750 nM.

Le domaine R1 de l'AnxA2 possède un fort pouvoir thérapeutique pour contrer l'action de PCSK9 sur la dégradation du LDLR et ainsi réduire les taux de LDL-cholestérol plasmatique. Outre la fonction connue de la région N-terminale de l'AnxA2, importante pour l'activation de la fibrinolyse, nous avons pu attribuer une nouvelle et unique fonction pour cette protéine particulièrement pour les résidus 34 à 108.²⁷⁴ Il serait donc très pertinent d'entreprendre une étude cristallographique afin déterminer les résidues directement impliqués dans le complexe PCSK9•AnxA2. À partir du domaine d'interaction, certaines mutations pourraient être générées, dans le domaine R1 de l'AnxA2, afin de maximiser d'avantage son pouvoir inhibiteur sur PCSK9. Aussi, il serait possible d'entreprendre une étude de mutagenèse à grande échelle en utilisant la méthode du « *phage display* » couplé à du séquençage à haut débit.³³⁶ Puisque l'AnxA2 n'est pas exprimée dans les hépatocytes (Chapitre IV, Fig. S2), nous analysons présentement le rôle *in vivo* de l'AnxA2 dans les tissus périphériques quant au contrôle des niveaux du LDLR par PCSK9 à l'aide de souris déficientes (*AnxA2*^{-/-}, collaboration avec le Dre. Hajjar, *Cornell University*). À l'inverse, l'ajout exogène d'AnxA2 (surabondance hépatique) devrait contrer l'action de PCSK9 sur la dégradation du LDLR et ainsi favoriser la clairance des particules LDL circulantes. Ceci pourrait être fortement indicateur sur le pouvoir thérapeutique de l'AnxA2 (ou ses dérivés) comme agent réducteur du cholestérol plasmatique. De plus, nous étudions aussi

l'interrelation entre les polymorphismes humains connus situés dans le domaine R1 (R63S et V98L) sur la liaison et la fonction de PCSK9.

Dans l'article 3 (Chapitre IV), nous avons identifié le domaine R1 de l'AnxA2 comme unique inhibiteur naturel de PCSK9. À partir des informations structurales obtenues, il serait possible d'imaginer que l'AnxA2 ou des molécules dérivées (peptidomimétique) puisse être utilisé très prochainement pour contrer l'hypercholestérolémie et les maladies cardiovasculaires.

5.4 Focus sur le domaine CHRD de PCSK9

Selon la base de données LOVD (*British Heart Foundation et University College London*, <http://www.ucl.ac.uk/ldlr/Current/>), 101 variations génétiques sont jusqu'à maintenant répertoriées au locus de la convertase PCSK9 (variations; 95%, insertions; 3.7% et délétions; 1.2%).^{112, 113, 128} On remarque une distribution plutôt équivalente des mutations entre les domaines de PCSK9 (*voir* Chapitre I.1.6.5, prorégion; 33.6%, catalytique; 36.7% et CHRD; 29.8%). Bien que le domaine catalytique soit important pour la liaison directe avec le LDLR²⁴³, il est donc évident que les autres régions de PCSK9 participent à la fonction de cette convertase dans la dégradation du récepteur. Pour ce qui est de la prorégion, certaines mutations peuvent interférer avec le bon repliement de l'enzyme et donc moduler son effet. Par contre, le domaine C-terminal riche en cystéines et histidines (CHRD; *Cys/His-rich domain*) semble posséder son identité propre. En effet, le CHRD peut être produit et sécrété sans le reste de l'enzyme et s'avère être fonctionnel puisqu'il est capable de lier l'AnxA2. (Chapitre IV, Fig. 1, 3 et 4).¹⁷⁸ Selon des analyses phylogéniques à partir de 14 espèces de primates, une étude a mis en évidence que le CHRD fut l'œuvre d'une sélection naturelle positive au cours de l'évolution.³³⁷ Il existe maintenant plusieurs évidences démontrant le rôle essentiel du CHRD dans le trafic cellulaire de PCSK9 ainsi dans l'induction de la dégradation du LDLR.^{174, 175, 178, 338} En effet, le retrait du domaine CHRD ou sa neutralisation soit à l'aide d'anticorps spécifique

ou l'ajout d'AnxA2 interfère avec la capacité de PCSK9 à induire la dégradation du récepteur. La prochaine étape dans l'élucidation du mécanisme reliant PCSK9 au LDLR réside fort probablement dans le domaine CHRD. L'identification de nouveaux partenaires pour PCSK9 est une piste forte intéressante à envisager.

Conclusion

Les maladies cardiovasculaires (MCV) et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont les principales causes d'incapacité et de décès en Amérique du Nord. On estime à 1/500 la fréquence de l'hypercholestérolémie familiale dans la population où près de 84% des cas sont expliqués par des mutations dans les locis codant pour les gènes LDLR, apoB et PCSK9. En collaboration avec l'équipe du Dre. Boileau de L'INSERM en France, notre laboratoire a récemment identifié PCSK9 comme étant le troisième gène qui régule directement les taux de LDL-cholestérol. En effet, des mutations génétiques invalidantes pour PCSK9 réduisent de ~88% le risque de MCV. Dans les hépatocytes, PCSK9 lie directement le LDLR induisant une réorientation et une dégradation intracellulaire du récepteur, menant ainsi à une hausse du cholestérol plasmatique.

Dans cet ouvrage, nous avons d'abord démontré, pour la première fois, que PCSK9 lie et induit aussi la dégradation de d'autres membres de la famille du LDLR soit les récepteurs ApoER2 et VLDLR (Chapitre II).²⁹¹ Ensuite, par une série d'expériences clés, nous avons mis en évidence que l'intégrité du trafic intracellulaire est capital pour la dégradation endogène du LDLR par PCSK9 (Chapitre III).²⁹⁵ Finalement, nous avons identifié le domaine R1 de l'Annexine A2 comme premier et unique inhibiteur naturel de PCSK9 (Chapitre IV).³³⁸

En somme, nos travaux ont permis d'approfondir nos connaissances sur le spectre d'action de PCSK9, son lieu d'action et aussi sur une approche thérapeutique à fort potentiel. Très prochainement, nous verrons sans doute l'apparition d'une molécule capable d'inhiber PCSK9, réduire le cholestérol plasmatique et le risque de développement de MCV. En plus d'offrir une stratégie pour inhiber l'action de PCSK9 sur le LDLR (*e.g.* AnxA2), l'intégration de nos résultats s'avère être très pertinente dans notre compréhension de la biologie de PCSK9, et nous informe sur les effets pléiotropiques potentiels (*e.g.* causés par ApoER2 et VLDLR) et le ciblage thérapeutique (*e.g.* extra-, plasma ; ou intracellulaire, hépatocytes) d'un éventuel inhibiteur.

Bibliographie

1. Mackay J, Mensah GA. The Atlas of Heart Disease and Stroke. *World Health Organization*. 2004:112p.
2. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. Feb 23 2010;121(7):e46-e215.
3. Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*. Feb 21 2008;451(7181):904-913.
4. Genest J, McPherson R, Frohlich J, et al. 2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult - 2009 recommendations. *Can. J. Cardiol*. Oct 2009;25(10):567-579.
5. Fondation des Maladies du Coeur du Canada.
<http://www.hsf.ca/research/fr/general/home.html>.
6. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. Nov 2006;3(11):e442.
7. Dawber TR, Meadors GF, Moore FE, Jr. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am. J. Public Health Nations Health*. Mar 1951;41(3):279-281.
8. Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation*. May 16 2006;113(19):2335-2362.
9. D'Agostino RB, Sr., Vasan RS, Pencina MJ, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*. Feb 12 2008;117(6):743-753.
10. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J, 3rd. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann. Intern. Med*. Jul 1961;55:33-50.
11. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N. Engl. J. Med*. Nov 14 2002;347(20):1557-1565.
12. Wang TJ, Larson MG, Levy D, et al. Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N. Engl. J. Med*. Feb 12 2004;350(7):655-663.
13. Danesh J, Lewington S, Thompson SG, et al. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA*. Oct 12 2005;294(14):1799-1809.

14. Mangoni AA, Jackson SH. Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects. *Am. J. Med.* May 2002;112(7):556-565.
15. Miller KA, Siscovick DS, Sheppard L, et al. Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *N. Engl. J. Med.* Feb 1 2007;356(5):447-458.
16. McNamara JR, Warnick GR, Cooper GR. A brief history of lipid and lipoprotein measurements and their contribution to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta.* Jul 23 2006;369(2):158-167.
17. Fondation Nobel. <http://nobelprize.org/>.
18. Rudel LL, Shelness GS. Cholesterol esters and atherosclerosis-a game of ACAT and mouse. *Nat. Med.* Dec 2000;6(12):1313-1314.
19. Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 2003;72:137-174.
20. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* Feb 1 1990;343(6257):425-430.
21. Goldfine H, Vance DE. Obituary: Konrad E. Bloch (1912-2000). *Nature.* Feb 15 2001;409(6822):779.
22. Grant JK. Feodor Lynen, 1911--1979. *Nature.* May 15 1980;285(5761):177.
23. Gil G, Brown MS, Goldstein JL. Cytoplasmic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from the hamster. II. Isolation of the gene and characterization of the 5' flanking region. *J. Biol. Chem.* Mar 15 1986;261(8):3717-3724.
24. Reynolds GA, Basu SK, Osborne TF, et al. HMG CoA reductase: a negatively regulated gene with unusual promoter and 5' untranslated regions. *Cell.* Aug 1984;38(1):275-285.
25. Do R, Kiss RS, Gaudet D, Engert JC. Squalene synthase: a critical enzyme in the cholesterol biosynthesis pathway. *Clin. Genet.* Jan 2009;75(1):19-29.
26. Endo A. A gift from nature: the birth of the statins. *Nat. Med.* Oct 2008;14(10):1050-1052.
27. Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Eur. J. Biochem.* Jul 1 1977;77(1):31-36.
28. Downton C, Clark I. Statins--the heart of the matter. *Nat Rev Drug Discov.* May 2003;2(5):343-344.
29. Kidd J. Life after statin patent expiries. *Nat Rev Drug Discov.* Oct 2006;5(10):813-814.
30. Amarenco P, Bogousslavsky J, Callahan A, 3rd, et al. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *N. Engl. J. Med.* Aug 10 2006;355(6):549-559.

31. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*. May 11 2001;292(5519):1160-1164.
32. Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, et al. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA*. Apr 5 2006;295(13):1556-1565.
33. Seiki S, Frishman WH. Pharmacologic inhibition of squalene synthase and other downstream enzymes of the cholesterol synthesis pathway: a new therapeutic approach to treatment of hypercholesterolemia. *Cardiol. Rev.* Mar-Apr 2009;17(2):70-76.
34. Davignon J, Leiter LA. Ongoing clinical trials of the pleiotropic effects of statins. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1(1):29-40.
35. Lodish HB, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W.H. Freeman & Co; c1999.
36. Dietschy JM. Regulation of cholesterol metabolism in man and in other species. *Klin. Wochenschr.* Apr 16 1984;62(8):338-345.
37. Schoenheimer R, Breusch F. Synthesis and destruction of cholesterol in the organism. *J. Biol. Chem.* 1933;103:439-448.
38. Radhakrishnan A, Goldstein JL, McDonald JG, Brown MS. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metab.* Dec 2008;8(6):512-521.
39. Sudhof TC, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. 42 bp element from LDL receptor gene confers end-product repression by sterols when inserted into viral TK promoter. *Cell*. Mar 27 1987;48(6):1061-1069.
40. Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, et al. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*. Oct 8 1993;75(1):187-197.
41. Hua X, Yokoyama C, Wu J, et al. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Dec 15 1993;90(24):11603-11607.
42. Nohturfft A, Brown MS, Goldstein JL. Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *J. Biol. Chem.* Jul 3 1998;273(27):17243-17250.
43. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* May 2002;109(9):1125-1131.

44. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, 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.* Oct 14 2003;100(21):12027-12032.
45. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, et al. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* Aug 2004;24(8):1454-1459.
46. Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell.* Apr 8 1994;77(1):53-62.
47. Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell.* Jun 28 1996;85(7):1037-1046.
48. Rawson RB, Zelenski NG, Nijhawan D, et al. Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol. Cell.* Dec 1997;1(1):47-57.
49. Seidah NG, Mowla SJ, Hamelin J, et al. Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Feb 16 1999;96(4):1321-1326.
50. Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, et al. Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol. Cell.* Oct 1998;2(4):505-514.
51. Hua X, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS. Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell.* Nov 1 1996;87(3):415-426.
52. Chang TY, Limanek JS. Regulation of cytosolic acetoacetyl coenzyme A thiolase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and mevalonate kinase by low density lipoprotein and by 25-hydroxycholesterol in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* Aug 25 1980;255(16):7787-7795.
53. Korn BS, Shimomura I, Bashmakov Y, et al. Blunted feedback suppression of SREBP processing by dietary cholesterol in transgenic mice expressing sterol-resistant SCAP(D443N). *J. Clin. Invest.* Dec 15 1998;102(12):2050-2060.
54. Matsuda M, Korn BS, Hammer RE, et al. SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation. *Genes Dev.* May 15 2001;15(10):1206-1216.
55. Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, 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.* Aug 23 2002;110(4):489-500.

56. Brown AJ, Sun L, Feramisco JD, Brown MS, Goldstein JL. Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol. Cell.* Aug 2002;10(2):237-245.
57. Espenshade PJ, Li WP, Yabe D. Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Sep 3 2002;99(18):11694-11699.
58. Sun LP, Seemann J, Goldstein JL, Brown MS. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Apr 17 2007;104(16):6519-6526.
59. Sun LP, Li L, Goldstein JL, Brown MS. Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* Jul 15 2005;280(28):26483-26490.
60. Brown MS, Goldstein JL. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J. Lipid Res.* Apr 2009;50 Suppl:S15-27.
61. Olson RE. Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J. Nutr.* Feb 1998;128(2 Suppl):439S-443S.
62. Vance DE, Vance JE. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Fifth ed: Elsevier B.V.; 2008.
63. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Jr., Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.* Dec 1 1984;25(12):1277-1294.
64. Masson CJ, Plat J, Mensink RP, et al. Fatty acid- and cholesterol transporter protein expression along the human intestinal tract. *PLoS One.* 5(4):e10380.
65. Davies JP, Levy B, Ioannou YA. Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family: identification and characterization of NPC1L1. *Genomics.* Apr 15 2000;65(2):137-145.
66. Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science.* Feb 20 2004;303(5661):1201-1204.
67. Breslow JL, Ross D, McPherson J, et al. Isolation and characterization of cDNA clones for human apolipoprotein A-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Nov 1982;79(22):6861-6865.
68. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* Aug 1999;22(4):336-345.
69. Mulligan JD, Flowers MT, Tebon A, et al. ABCA1 is essential for efficient basolateral cholesterol efflux during the absorption of dietary cholesterol in chickens. *J. Biol. Chem.* Apr 11 2003;278(15):13356-13366.
70. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.* Aug 1999;22(4):347-351.

71. Berge KE, Tian H, Graf GA, et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*. Dec 1 2000;290(5497):1771-1775.
72. Sharp D, Blinderman L, Combs KA, et al. Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia. *Nature*. Sep 2 1993;365(6441):65-69.
73. Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J. Mol. Med.* Dec 2002;80(12):753-769.
74. Havel RJ. Chylomicron remnants: hepatic receptors and metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* Oct 1995;6(5):312-316.
75. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet.* Feb 2009;10(2):109-121.
76. Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science*. Jan 16 1976;191(4223):150-154.
77. Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1985;1:1-39.
78. Rudenko G, Henry L, Henderson K, et al. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science*. Dec 20 2002;298(5602):2353-2358.
79. Beglova N, Blacklow SC. The LDL receptor: how acid pulls the trigger. *Trends Biochem. Sci.* Jun 2005;30(6):309-317.
80. Arias-Moreno X, Velazquez-Campoy A, Rodriguez JC, Pocovi M, Sancho J. Mechanism of low density lipoprotein (LDL) release in the endosome: implications of the stability and Ca²⁺ affinity of the fifth binding module of the LDL receptor. *J. Biol. Chem.* Aug 15 2008;283(33):22670-22679.
81. van der Westhuyzen DR, Gevers W, Coetzee GA. Cathepsin-D-dependent initiation of the hydrolysis by lysosomal enzymes of apoprotein B from low-density lipoproteins. *Eur. J. Biochem.* Nov 1980;112(1):153-160.
82. Linke M, Gordon RE, Brillard M, Lecaille F, Lalmanach G, Bromme D. Degradation of apolipoprotein B-100 by lysosomal cysteine cathepsins. *Biol. Chem.* Sep 2006;387(9):1295-1303.
83. Sloan HR, Fredrickson DS. Enzyme deficiency in cholesteryl ester storage idisease. *J. Clin. Invest.* Jul 1972;51(7):1923-1926.
84. Hoeg JM, Demosky SJ, Jr., Pescovitz OH, Brewer HB, Jr. Cholesteryl ester storage disease and Wolman disease: phenotypic variants of lysosomal acid cholesteryl ester hydrolase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* Nov 1984;36(6):1190-1203.

85. Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, et al. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*. Jul 11 1997;277(5323):228-231.
86. Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, et al. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science*. Dec 22 2000;290(5500):2298-2301.
87. Kwon HJ, Abi-Mosleh L, Wang ML, et al. Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell*. Jun 26 2009;137(7):1213-1224.
88. Davies JP, Chen FW, Ioannou YA. Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Science*. Dec 22 2000;290(5500):2295-2298.
89. Wojtanik KM, Liscum L. The transport of low density lipoprotein-derived cholesterol to the plasma membrane is defective in NPC1 cells. *J. Biol. Chem*. Apr 25 2003;278(17):14850-14856.
90. Cruz JC, Sugii S, Yu C, Chang TY. Role of Niemann-Pick type C1 protein in intracellular trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *J. Biol. Chem*. Feb 11 2000;275(6):4013-4021.
91. Urano Y, Watanabe H, Murphy SR, et al. Transport of LDL-derived cholesterol from the NPC1 compartment to the ER involves the trans-Golgi network and the SNARE protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Oct 28 2008;105(43):16513-16518.
92. Kulinski A, Vance JE. Lipid homeostasis and lipoprotein secretion in Niemann-Pick C1-deficient hepatocytes. *J. Biol. Chem*. Jan 19 2007;282(3):1627-1637.
93. Chang TY, Chang CC, Ohgami N, Yamauchi Y. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2006;22:129-157.
94. Garver WS, Jelinek D, Francis GA, Murphy BD. The Niemann-Pick C1 gene is downregulated by feedback inhibition of the SREBP pathway in human fibroblasts. *J. Lipid Res*. May 2008;49(5):1090-1102.
95. Movva R, Rader DJ. Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function. *Clin. Chem*. May 2008;54(5):788-800.
96. Klucken J, Buchler C, Orso E, et al. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Jan 18 2000;97(2):817-822.
97. Norum KR, Glomset JA, Nichols AV, Forte T. Plasma lipoproteins in familial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency: physical and chemical studies of low and high density lipoproteins. *J. Clin. Invest*. May 1971;50(5):1131-1140.
98. Shah PK, Nilsson J, Kaul S, et al. Effects of recombinant apolipoprotein A-I(Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. Mar 3 1998;97(8):780-785.

99. Bailey D, Jahagirdar R, Gordon A, et al. RVX-208: a small molecule that increases apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein cholesterol in vitro and in vivo. *J. Am. Coll. Cardiol.* Jun 8 2010;55(23):2580-2589.
100. Batal R, Tremblay M, Krimbou L, et al. Familial HDL deficiency characterized by hypercatabolism of mature apoA-I but not proapoA-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* Apr 1998;18(4):655-664.
101. Eto M, Miyata O, Noda K, Makino I. A family of homozygous familial hyperalphalipoproteinemia with complete deficiency of cholesteryl ester transfer activity. *Artery.* 1990;17(4):202-212.
102. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N. Engl. J. Med.* Nov 22 2007;357(21):2109-2122.
103. Krishna R, Anderson MS, Bergman AJ, et al. Effect of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor, anacetrapib, on lipoproteins in patients with dyslipidaemia and on 24-h ambulatory blood pressure in healthy individuals: two double-blind, randomised placebo-controlled phase I studies. *Lancet.* Dec 8 2007;370(9603):1907-1914.
104. Florentin M, Liberopoulos EN, Wierzbicki AS, Mikhailidis DP. Multiple actions of high-density lipoprotein. *Curr. Opin. Cardiol.* Jul 2008;23(4):370-378.
105. Müller C. Xanthoma, hypercholesterolemia, angina pectoris. *Acta Med Scand Suppl.* 1938(89):75-84.
106. Thannhauser S, Magendantz H. The different clinical groups of xanthomatous diseases; a clinical physiological study of 22 cases. *Ann Intern Med.* 1938;11:1662-1746.
107. Davignon J, Dufour R. *An Atlas of Investigation and Diagnosis: PRIMARY HYPERLIPIDEMIAS.* Oxford: Clinical Publishing; 2007.
108. Brown MS, Hobbs HH, Goldstein JL. *The metabolic basis of inherited disease: Familial hypercholesterolemia.* 6th ed. ed. New York: McGraw-Hill; 1989.
109. Brown MS, Goldstein JL. 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.* Mar 1974;71(3):788-792.
110. Hobbs HH, Brown MS, Russell DW, Davignon J, Goldstein JL. Deletion in the gene for the low-density-lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* Sep 17 1987;317(12):734-737.
111. Leitersdorf E, Tobin EJ, Davignon J, Hobbs HH. Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. *J. Clin. Invest.* Apr 1990;85(4):1014-1023.
112. Leigh SE, Foster AH, Whittall RA, Hubbart CS, Humphries SE. Update and analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database. *Ann. Hum. Genet.* Jul 2008;72(Pt 4):485-498.

113. Allelic variants for Familial Hypercholesterolemia database.
<http://www.ucl.ac.uk/ldlr/Current/>.
114. Vega GL, Grundy SM. In vivo evidence for reduced binding of low density lipoproteins to receptors as a cause of primary moderate hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.* Nov 1986;78(5):1410-1414.
115. Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Jan 1989;86(2):587-591.
116. Ludwig EH, McCarthy BJ. Haplotype analysis of the human apolipoprotein B mutation associated with familial defective apolipoprotein B100. *Am. J. Hum. Genet.* Oct 1990;47(4):712-720.
117. Garcia CK, Wilund K, Arca M, et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science.* May 18 2001;292(5520):1394-1398.
118. He G, Gupta S, Yi M, Michaely P, Hobbs HH, Cohen JC. ARH is a modular adaptor protein that interacts with the LDL receptor, clathrin, and AP-2. *J. Biol. Chem.* Nov 15 2002;277(46):44044-44049.
119. Jones C, Hammer RE, Li WP, Cohen JC, Hobbs HH, Herz J. Normal sorting but defective endocytosis of the low density lipoprotein receptor in mice with autosomal recessive hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* Aug 1 2003;278(31):29024-29030.
120. Wu JH, Peppel K, Nelson CD, et al. The adaptor protein beta-arrestin2 enhances endocytosis of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* Nov 7 2003;278(45):44238-44245.
121. Sirinian MI, Belleudi F, Campagna F, et al. Adaptor protein ARH is recruited to the plasma membrane by low density lipoprotein (LDL) binding and modulates endocytosis of the LDL/LDL receptor complex in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* Nov 18 2005;280(46):38416-38423.
122. Garuti R, Jones C, Li WP, et al. The modular adaptor protein autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) promotes low density lipoprotein receptor clustering into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* Dec 9 2005;280(49):40996-41004.
123. Mishra SK, Watkins SC, Traub LM. The autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein interfaces directly with the clathrin-coat machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Dec 10 2002;99(25):16099-16104.
124. Jeon H, Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu. Rev. Biochem.* 2005;74:535-562.
125. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* Jun 2003;34(2):154-156.

126. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, 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.* Feb 4 2003;100(3):928-933.
127. Seidah NG, Prat A. The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J. Mol. Med.* Jul 2007;85(7):685-696.
128. Leigh SE, Leren TP, Humphries SE. Commentary PCSK9 variants: A new database. *Atherosclerosis.* Mar 2009;203(1):32-33.
129. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat. Genet.* Feb 2005;37(2):161-165.
130. Allard D, Amsellem S, Abifadel M, et al. Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* Nov 2005;26(5):497.
131. Leren TP. Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin. Genet.* May 2004;65(5):419-422.
132. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am. J. Hum. Genet.* Sep 2006;79(3):514-523.
133. Berge KE, Ose L, Leren TP. Missense mutations in the PCSK9 gene are associated with hypocholesterolemia and possibly increased response to statin therapy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* May 2006;26(5):1094-1100.
134. Hooper AJ, Marais AD, Tanyanyiwa DM, Burnett JR. The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis.* Aug 2007;193(2):445-448.
135. Brown MS, Goldstein JL. Biomedicine. Lowering LDL--not only how low, but how long? *Science.* Mar 24 2006;311(5768):1721-1723.
136. Wenner Moyer M. The search beyond statins. *Nat. Med.* Feb;16(2):150-153.
137. Lou KJ. The secreted secret of PCSK9. *SciBX.* 2009;2(22):895.
138. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Apr 12 2005;102(15):5374-5379.
139. Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology.* Aug 2008;48(2):646-654.

140. Park SW, Moon YA, Horton JD. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J. Biol. Chem.* Nov 26 2004;279(48):50630-50638.
141. Maxwell KN, 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.* May 4 2004;101(18):7100-7105.
142. Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet.* Feb 2005;6(2):109-118.
143. Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat. Genet.* Jan 13 2008.
144. Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, et al. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat. Genet.* Jan 2009;41(1):47-55.
145. Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat. Genet.* Jan 2009;41(1):56-65.
146. Lusis AJ, Pajukanta P. A treasure trove for lipoprotein biology. *Nat. Genet.* Feb 2008;40(2):129-130.
147. Marques-Pinheiro A, Marduel M, Rabes JP, et al. A fourth locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps at 16q22.1. *Eur. J. Hum. Genet.* Jun 23.
148. Cenarro A, Garcia-Otin AL, Tejedor MT, et al. A presumptive new locus for autosomal dominant hypercholesterolemia mapping to 8q24.22. *Clin. Genet.* Jun 15 2010.
149. Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, Lopez-Otin C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet.* Jul 2003;4(7):544-558.
150. Erez E, Fass D, Bibi E. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature.* May 21 2009;459(7245):371-378.
151. Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer.* Jul 20 2005;115(6):849-860.
152. Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jan 2005;6(1):32-43.
153. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nov 2004;5(11):897-907.
154. Seidah NG, Mayer G, Zaid A, et al. The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008;40(6-7):1111-1125.
155. Seidah NG, Prat A. Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. *Essays Biochem.* 2002;38:79-94.

156. Seidah NG, Benjannet S, Hamelin J, et al. The subtilisin/kexin family of precursor convertases. Emphasis on PC1, PC2/7B2, POMC and the novel enzyme SKI-1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Oct 20 1999;885:57-74.
157. Seidah NG, Chretien M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* Nov 27 1999;848(1-2):45-62.
158. Julius D, Brake A, Blair L, Kunisawa R, Thorner J. Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell.* Jul 1984;37(3):1075-1089.
159. Thomas G, Thorne BA, Thomas L, et al. Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science.* Jul 8 1988;241(4862):226-230.
160. Naureckiene S, Ma L, Sreekumar K, et al. Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch. Biochem. Biophys.* Dec 1 2003;420(1):55-67.
161. Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc.* 2007;2(4):953-971.
162. Bissonnette L, Charest G, Longpre JM, Lavigne P, Leduc R. Identification of furin pro-region determinants involved in folding and activation. *Biochem. J.* May 1 2004;379(Pt 3):757-763.
163. Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Oct 2002;3(10):753-766.
164. Shinde UP, Liu JJ, Inouye M. Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones. *Nature.* Oct 2 1997;389(6650):520-522.
165. Carter P, Wells JA. Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature.* Apr 7 1988;332(6164):564-568.
166. Henrich S, Cameron A, Bourenkov GP, et al. The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat. Struct. Biol.* Jul 2003;10(7):520-526.
167. Henrich S, Lindberg I, Bode W, Than ME. Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: explanation of their specificity. *J. Mol. Biol.* Jan 14 2005;345(2):211-227.
168. Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, et al. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol.* May 2007;14(5):413-419.
169. Jutras I, Seidah NG, Reudelhuber TL. A predicted alpha -helix mediates targeting of the proprotein convertase PC1 to the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.* Dec 22 2000;275(51):40337-40343.

170. Denault J, Bissonnette L, Longpre J, Charest G, Lavigne P, Leduc R. Ectodomain shedding of furin: kinetics and role of the cysteine-rich region. *FEBS Lett.* Sep 11 2002;527(1-3):309-314.
171. Wang L, Yang G, Wu X. Identification of the role of a cysteine-rich region of PC6B by determining the enzymatic characteristics of its mutants. *Mol. Biotechnol.* May 2004;27(1):15-22.
172. Nour N, Mayer G, Mort JS, et al. The cysteine-rich domain of the secreted proprotein convertases PC5A and PACE4 functions as a cell surface anchor and interacts with tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol. Biol. Cell.* Nov 2005;16(11):5215-5226.
173. Mayer G, Hamelin J, Asselin MC, et al. The regulated cell surface zymogen activation of the proprotein convertase PC5A directs the processing of its secretory substrates. *J. Biol. Chem.* Jan 25 2008;283(4):2373-2384.
174. Zhang DW, Garuti R, Tang WJ, Cohen JC, Hobbs HH. Structural requirements for PCSK9-mediated degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Sep 2 2008;105(35):13045-13050.
175. Ni YG, Condra JH, Orsatti L, et al. A proprotein convertase subtilisin-like/kexin type 9 (PCSK9) C-terminal domain antibody antigen-binding fragment inhibits PCSK9 internalization and restores low density lipoprotein uptake. *J. Biol. Chem.* Apr 23 2010;285(17):12882-12891.
176. Teuchert M, Berghofer S, Klenk HD, Garten W. Recycling of furin from the plasma membrane. Functional importance of the cytoplasmic tail sorting signals and interaction with the AP-2 adaptor medium chain subunit. *J. Biol. Chem.* Dec 17 1999;274(51):36781-36789.
177. Pullikotil P, Benjannet S, Mayne J, Seidah NG. The proprotein convertase SKI-1/S1P: alternate translation and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* Sep 14 2007;282(37):27402-27413.
178. Nassoury N, Blasiolo DA, Tebon Oler A, et al. The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic.* Jun 2007;8(6):718-732.
179. Stawowy P, Marcinkiewicz J, Graf K, et al. Selective expression of the proprotein convertases furin, pc5, and pc7 in proliferating vascular smooth muscle cells of the rat aorta in vitro. *J. Histochem. Cytochem.* Mar 2001;49(3):323-332.
180. Marcinkiewicz M, Day R, Seidah NG, Chretien M. Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and alpha-melanotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Jun 1 1993;90(11):4922-4926.

181. Benjannet S, Rondeau N, Day R, Chretien M, Seidah NG. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* May 1 1991;88(9):3564-3568.
182. Schaner P, Todd RB, Seidah NG, Nillni EA. Processing of prothyrotropin-releasing hormone by the family of prohormone convertases. *J. Biol. Chem.* Aug 8 1997;272(32):19958-19968.
183. Smeekens SP, Montag AG, Thomas G, et al. Proinsulin processing by the subtilisin-related proprotein convertases furin, PC2, and PC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Sep 15 1992;89(18):8822-8826.
184. Rouille Y, Westermark G, Martin SK, Steiner DF. Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in alpha TC1-6 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Apr 12 1994;91(8):3242-3246.
185. Mbikay M, Raffin-Sanson ML, Tadros H, Sirois F, Seidah NG, Chretien M. Structure of the gene for the testis-specific proprotein convertase 4 and of its alternate messenger RNA isoforms. *Genomics.* Mar 15 1994;20(2):231-237.
186. Seidah NG, Day R, Hamelin J, Gaspar A, Collard MW, Chretien M. Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase. *Mol. Endocrinol.* Oct 1992;6(10):1559-1570.
187. Poirier S, Prat A, Marcinkiewicz E, et al. Implication of the proprotein convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system. *J. Neurochem.* Aug 2006;98(3):838-850.
188. Careskey HE, Davis RA, Alborn WE, Troutt JS, Cao G, Konrad RJ. Atorvastatin increases human serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J. Lipid Res.* Feb 2008;49(2):394-398.
189. Mayne J, Dewpura T, Raymond A, et al. Plasma PCSK9 levels are significantly modified by statins and fibrates in humans. *Lipids Health Dis.* 2008;7:22.
190. Davignon J, Dubuc G. Statins and ezetimibe modulate plasma proprotein convertase subtilisin kexin-9 (PCSK9) levels. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 2009;120:163-173.
191. Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Jul 2009;94(7):2537-2543.
192. Gouni-Berthold I, Berthold HK, Gylling H, 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.* May 2008;198(1):198-207.
193. Dubuc G, Tremblay M, Pare G, et al. A new method for measurement of total plasma PCSK9: clinical applications. *J. Lipid Res.* Jan 2010;51(1):140-149.

194. Maxwell KN, Soccio RE, Duncan EM, Sehayek E, Breslow JL. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J. Lipid Res.* Nov 2003;44(11):2109-2119.
195. Leblond F, Seidah NG, Precourt LP, Delvin E, Dominguez M, Levy E. Regulation of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Apr 2009;296(4):G805-815.
196. Alborn WE, Cao G, Careskey HE, et al. Serum Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Is Correlated Directly with Serum LDL Cholesterol. *Clin. Chem.* Oct 2007;53(10):1814-1819.
197. Lambert G, Ancellin N, Charlton F, et al. Plasma PCSK9 concentrations correlate with LDL and total cholesterol in diabetic patients and are decreased by fenofibrate treatment. *Clin. Chem.* Jun 2008;54(6):1038-1045.
198. Baass A, Dubuc G, Tremblay M, et al. Plasma PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in a population-based sample of children and adolescents. *Clin. Chem.* Sep 2009;55(9):1637-1645.
199. Zelcer N, Tontonoz P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J. Clin. Invest.* Mar 2006;116(3):607-614.
200. Beaven SW, Tontonoz P. Nuclear receptors in lipid metabolism: targeting the heart of dyslipidemia. *Annu. Rev. Med.* 2006;57:313-329.
201. Schmidt RJ, Ficorilli JV, Zhang Y, et al. A 15-ketosterol is a liver X receptor ligand that suppresses sterol-responsive element binding protein-2 activity. *J. Lipid Res.* May 2006;47(5):1037-1044.
202. Costet P, Cariou B, Lambert G, et al. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J. Biol. Chem.* Mar 10 2006;281(10):6211-6218.
203. Nilsson LM, Abrahamsson A, Sahlin S, et al. Bile acids and lipoprotein metabolism: effects of cholestyramine and chenodeoxycholic acid on human hepatic mRNA expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Jun 8 2007;357(3):707-711.
204. Langhi C, Le May C, Kourimate S, et al. Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett.* Mar 19 2008;582(6):949-955.
205. Xu Y, Wang Y, Yan L, et al. Proteomic analysis reveals a synergistic mechanism of fluconazole and berberine against fluconazole-resistant *Candida albicans*: endogenous ROS augmentation. *J Proteome Res.* Nov 2009;8(11):5296-5304.
206. Yu HH, Kim KJ, Cha JD, et al. Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Food.* Winter 2005;8(4):454-461.

207. Kuo CL, Chi CW, Liu TY. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* Jan 20 2004;203(2):127-137.
208. Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA, Lewis K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Feb 15 2000;97(4):1433-1437.
209. Kong W, Wei J, Abidi P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat. Med.* Dec 2004;10(12):1344-1351.
210. Abidi P, Zhou Y, Jiang JD, Liu J. Extracellular signal-regulated kinase-dependent stabilization of hepatic low-density lipoprotein receptor mRNA by herbal medicine berberine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* Oct 2005;25(10):2170-2176.
211. Cameron J, Ranheim T, Kulseth MA, Leren TP, Berge KE. Berberine decreases PCSK9 expression in HepG2 cells. *Atherosclerosis.* Feb 15 2008.
212. Mendel DB, Hansen LP, Graves MK, Conley PB, Crabtree GR. HNF-1 alpha and HNF-1 beta (vHNF-1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro. *Genes Dev.* Jun 1991;5(6):1042-1056.
213. Jung D, Kullak-Ublick GA. Hepatocyte nuclear factor 1 alpha: a key mediator of the effect of bile acids on gene expression. *Hepatology.* Mar 2003;37(3):622-631.
214. Li H, Dong B, Park SW, Lee HS, Chen W, Liu J. Hepatocyte nuclear factor 1alpha plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine. *J. Biol. Chem.* Oct 16 2009;284(42):28885-28895.
215. Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science.* Feb 27 2004;303(5662):1378-1381.
216. Dong B, Wu M, Li H, et al. Strong induction of PCSK9 gene expression through HNF1 alpha and SREBP2: mechanism for the resistance to LDL-cholesterol lowering effect of statins in dyslipidemic hamsters. *J. Lipid Res.* Jun 2010;51(6):1486-1495.
217. Lalloyer F, Staels B. Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* May;30(5):894-899.
218. Jun M, Foote C, Lv J, et al. Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* May 29;375(9729):1875-1884.
219. Issemann I, Prince RA, Tugwood JD, Green S. The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs. *J. Mol. Endocrinol.* Aug 1993;11(1):37-47.
220. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* Dec 2006;58(4):726-741.

221. Lambert G, Jarnoux AL, Pineau T, 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*. Oct 2006;147(10):4985-4995.
222. Chan DC, Hamilton SJ, Rye KA, et al. Fenofibrate concomitantly decreases serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and very-low-density lipoprotein particle concentrations in statin-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Obes Metab*. Sep 2010;12(9):752-756.
223. Kourimate S, Le May C, Langhi C, et al. Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J. Biol. Chem*. Apr 11 2008;283(15):9666-9673.
224. Ouguerram K, Chetiveaux M, Zair Y, et al. Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. Aug 2004;24(8):1448-1453.
225. Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, 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*. Nov 19 2004;279(47):48865-48875.
226. Lalanne F, Lambert G, Amar MJ, et al. Wild-type PCSK9 inhibits LDL clearance but does not affect apoB-containing lipoprotein production in mouse and cultured cells. *J. Lipid Res*. Jun 2005;46(6):1312-1319.
227. Twisk J, Gillian-Daniel DL, Tebon A, Wang L, Barrett PH, Attie AD. The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *J. Clin. Invest*. Feb 2000;105(4):521-532.
228. Gillian-Daniel DL, Bates PW, Tebon A, Attie AD. Endoplasmic reticulum localization of the low density lipoprotein receptor mediates presecretory degradation of apolipoprotein B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. Apr 2 2002;99(7):4337-4342.
229. Blasiote DA, Oler AT, Attie AD. Regulation of ApoB secretion by the low density lipoprotein receptor requires exit from the endoplasmic reticulum and interaction with ApoE or ApoB. *J. Biol. Chem*. Apr 25 2008;283(17):11374-11381.
230. Nagai K, Oubridge C, Kuglstatter A, Menichelli E, Isel C, Jovine L. Structure, function and evolution of the signal recognition particle. *EMBO J*. Jul 15 2003;22(14):3479-3485.
231. Lemberg MK, Martoglio B. On the mechanism of SPP-catalysed intramembrane proteolysis; conformational control of peptide bond hydrolysis in the plane of the membrane. *FEBS Lett*. Apr 30 2004;564(3):213-218.
232. McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J. Biol. Chem*. Jul 20 2007;282(29):20799-20803.

233. Benjannet S, Rhainds D, Hamelin J, Nassoury N, Seidah NG. 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.* Oct 13 2006;281(41):30561-30572.
234. Piper DE, Jackson S, Liu Q, et al. The crystal structure of PCSK9: a regulator of plasma LDL-cholesterol. *Structure.* May 2007;15(5):545-552.
235. Hampton EN, Knuth MW, Li J, Harris JL, Lesley SA, Spraggon G. 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.* Sep 11 2007;104(37):14604-14609.
236. Walsh C. *Posttranslational Modification of Proteins: Expanding Nature's Inventory.* Greenwood Village: Roberts Publishers; 2006.
237. Seidah NG. PCSK9 as a therapeutic target of dyslipidemia. *Expert Opin Ther Targets.* Jan 2009;13(1):19-28.
238. Dewpura T, Raymond A, Hamelin J, et al. PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans. *FEBS J.* Jul 2008;275(13):3480-3493.
239. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J. Clin. Invest.* Nov 2006;116(11):2995-3005.
240. Saha S, Boyd J, Werner JM, et al. Solution structure of the LDL receptor EGF-AB pair: a paradigm for the assembly of tandem calcium binding EGF domains. *Structure.* Jun 2001;9(6):451-456.
241. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, 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.* Jun 22 2007;282(25):18602-18612.
242. Malby S, Pickering R, Saha S, Smallridge R, Linse S, Downing AK. The first epidermal growth factor-like domain of the low-density lipoprotein receptor contains a noncanonical calcium binding site. *Biochemistry (Mosc).* Feb 27 2001;40(8):2555-2563.
243. Kwon HJ, Lagace TA, McNutt MC, Horton JD, Deisenhofer J. Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Feb 12 2008;105(6):1820-1825.
244. McNutt MC, Kwon HJ, Chen C, Chen JR, Horton JD, Lagace TA. Antagonism of secreted PCSK9 increases low density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* Apr 17 2009;284(16):10561-10570.

245. Bottomley MJ, Cirillo A, Orsatti L, et al. Structural and biochemical characterization of the wild type PCSK9-EGF(AB) complex and natural familial hypercholesterolemia mutants. *J. Biol. Chem.* Jan 9 2009;284(2):1313-1323.
246. Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J, Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* Mar 1992;116(5):1071-1080.
247. Storrie B, Yang W. Dynamics of the interphase mammalian Golgi complex as revealed through drugs producing reversible Golgi disassembly. *Biochim. Biophys. Acta.* Aug 14 1998;1404(1-2):127-137.
248. Maxwell KN, Fisher EA, Breslow JL. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Feb 8 2005;102(6):2069-2074.
249. Hoseki J, Ushioda R, Nagata K. Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biochem.* Jan 2009;147(1):19-25.
250. Luzio JP, Bright NA, Pryor PR. The role of calcium and other ions in sorting and delivery in the late endocytic pathway. *Biochem. Soc. Trans.* Nov 2007;35(Pt 5):1088-1091.
251. Brown WJ, Goodhouse J, Farquhar MG. Mannose-6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes. *J. Cell Biol.* Oct 1986;103(4):1235-1247.
252. Fan D, Yancey PG, Qiu S, et al. Self-association of human PCSK9 correlates with its LDLR-degrading activity. *Biochemistry (Mosc).* Feb 12 2008;47(6):1631-1639.
253. Holla OL, Strom TB, Cameron J, Berge KE, Leren TP. A chimeric LDL receptor containing the cytoplasmic domain of the transferrin receptor is degraded by PCSK9. *Mol. Genet. Metab.* Feb 2009;99(2):149-156.
254. Strom TB, Holla OL, Tveten K, Cameron J, Berge KE, Leren TP. Disrupted recycling of the low density lipoprotein receptor by PCSK9 is not mediated by residues of the cytoplasmic domain. *Mol. Genet. Metab.* Jun 9 2010.
255. Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001;17:517-568.
256. Anderson RG, Vasile E, Mello RJ, Brown MS, Goldstein JL. Immunocytochemical visualization of coated pits and vesicles in human fibroblasts: relation to low density lipoprotein receptor distribution. *Cell.* Nov 1978;15(3):919-933.
257. Mello RJ, Brown MS, Goldstein JL, Anderson RG. LDL receptors in coated vesicles isolated from bovine adrenal cortex: binding sites unmasked by detergent treatment. *Cell.* Jul 1980;20(3):829-837.

258. Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* Feb 25 1990;265(6):3116-3123.
259. Owen DJ, Collins BM, Evans PR. Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004;20:153-191.
260. Bonifacino JS, Traub LM. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 2003;72:395-447.
261. Folsch H, Pypaert M, Schu P, Mellman I. Distribution and function of AP-1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* Feb 5 2001;152(3):595-606.
262. Deborde S, Perret E, Gravotta D, et al. Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature.* Apr 10 2008;452(7188):719-723.
263. Boucrot E, Saffarian S, Zhang R, Kirchhausen T. Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One.* 5(5):e10597.
264. Frank-Kamenetsky M, Grefhorst A, Anderson NN, 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.* Aug 19 2008;105(33):11915-11920.
265. Gupta N, Fisker N, Asselin MC, et al. A locked nucleic acid antisense oligonucleotide (LNA) silences PCSK9 and enhances LDLR expression in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2010;5(5):e10682.
266. Chan JC, Piper DE, Cao Q, et al. A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Jun 16 2009;106(24):9820-9825.
267. Shan L, Pang L, Zhang R, Murgolo NJ, Lan H, Hedrick JA. PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Oct 10 2008;375(1):69-73.
268. Herz J, Chen Y, Masiulis I, Zhou L. Expanding functions of lipoprotein receptors. *J. Lipid Res.* Apr 2009;50 Suppl:S287-292.
269. Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, et al. Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell.* Jun 11 1999;97(6):689-701.
270. Liu M, Wu G, Baysarowich J, et al. PCSK9 is not involved in the degradation of LDL receptors and BACE1 in the adult mouse brain. *J. Lipid Res.* Sep 2010;51(9):2611-2618.
271. Mayer H, Duit S, Hauser C, Schneider WJ, Nimpf J. Reconstitution of the Reelin signaling pathway in fibroblasts demonstrates that Dab1 phosphorylation is independent of receptor localization in lipid rafts. *Mol. Cell. Biol.* Jan 2006;26(1):19-27.

272. Poirier S, Zaid A, Mayer G, et al. Abstract 830: The Proprotein Convertase PCSK9 Induces The Degradation Of LDLR And Its Closest Family Members VLDLR And ApoER2. *Circulation*. 2007;116:II_161.
273. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr., Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* Mar 23 2006;354(12):1264-1272.
274. Hajjar KA, Krishnan S. Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med.* Jul 1999;9(5):128-138.
275. D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*. Apr 20 1995;374(6524):719-723.
276. Curran T, D'Arcangelo G. Role of reelin in the control of brain development. *Brain Res. Brain Res. Rev.* May 1998;26(2-3):285-294.
277. Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, et al. Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron*. Oct 1999;24(2):481-489.
278. Herz J. The LDL receptor gene family: (un)expected signal transducers in the brain. *Neuron*. Mar 2001;29(3):571-581.
279. Ozcelik T, Akarsu N, Uz E, et al. Mutations in the very low-density lipoprotein receptor VLDLR cause cerebellar hypoplasia and quadrupedal locomotion in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Mar 18 2008;105(11):4232-4236.
280. Jiang A, Hu W, Meng H, Gao H, Qiao X. Loss of VLDL receptor activates retinal vascular endothelial cells and promotes angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* Feb 2009;50(2):844-850.
281. Webb JC, Patel DD, Jones MD, Knight BL, Soutar AK. Characterization and tissue-specific expression of the human 'very low density lipoprotein (VLDL) receptor' mRNA. *Hum. Mol. Genet.* Apr 1994;3(4):531-537.
282. Tacke PJ, Hofker MH, Havekes LM, van Dijk KW. Living up to a name: the role of the VLDL receptor in lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* Jun 2001;12(3):275-279.
283. MacDougall ED, Kramer F, Polinsky P, et al. Aggressive very low-density lipoprotein (VLDL) and LDL lowering by gene transfer of the VLDL receptor combined with a low-fat diet regimen induces regression and reduces macrophage content in advanced atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice. *Am. J. Pathol.* Jun 2006;168(6):2064-2073.
284. Hofer F, Gruenberger M, Kowalski H, et al. Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Mar 1 1994;91(5):1839-1842.

285. Verdaguer N, Fita I, Reithmayer M, Moser R, Blaas D. X-ray structure of a minor group human rhinovirus bound to a fragment of its cellular receptor protein. *Nat Struct Mol Biol.* May 2004;11(5):429-434.
286. Palmenberg AC, Spiro D, Kuzmickas R, et al. Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. *Science.* Apr 3 2009;324(5923):55-59.
287. Marlovits TC, Abrahamsberg C, Blaas D. Very-low-density lipoprotein receptor fragment shed from HeLa cells inhibits human rhinovirus infection. *J. Virol.* Dec 1998;72(12):10246-10250.
288. Nizet S, Wruss J, Landstetter N, Snyers L, Blaas D. A mutation in the first ligand-binding repeat of the human very-low-density lipoprotein receptor results in high-affinity binding of the single V1 module to human rhinovirus 2. *J. Virol.* Dec 2005;79(23):14730-14736.
289. Kienberger F, Rankl C, Pastushenko V, Zhu R, Blaas D, Hinterdorfer P. Visualization of single receptor molecules bound to human rhinovirus under physiological conditions. *Structure.* Sep 2005;13(9):1247-1253.
290. Konecni T, Berka U, Pickl-Herk A, et al. Low pH-triggered beta-propeller switch of the low-density lipoprotein receptor assists rhinovirus infection. *J. Virol.* Nov 2009;83(21):10922-10930.
291. Poirier S, Mayer G, Benjannet 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.* Jan 25 2008;283(4):2363-2372.
292. Duit S, Mayer H, Blake SM, Schneider WJ, Nimpf J. Differential functions of ApoER2 and very low density lipoprotein receptor in Reelin signaling depend on differential sorting of the receptors. *J. Biol. Chem.* Feb 12;285(7):4896-4908.
293. Krieger M, Brown MS, Goldstein JL. Isolation of Chinese hamster cell mutants defective in the receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein. *J. Mol. Biol.* Aug 5 1981;150(2):167-184.
294. Beglova N, Jeon H, Fisher C, Blacklow SC. Cooperation between fixed and low pH-inducible interfaces controls lipoprotein release by the LDL receptor. *Mol. Cell.* Oct 22 2004;16(2):281-292.
295. Poirier S, Mayer G, Poupon V, et al. Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: evidence for an intracellular route. *J. Biol. Chem.* Oct 16 2009;284(42):28856-28864.
296. Conesa M, Prat A, Mort JS, Marvaldi J, Lissitzky JC, Seidah NG. Down-regulation of alpha v/beta 3 integrin via misrouting to lysosomes by overexpression of a beta 3Lamp1 fusion protein. *Biochem. J.* Mar 1 2003;370(Pt 2):703-711.

297. Grefhorst A, McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. *J. Lipid Res.* Jun 2008;49(6):1303-1311.
298. Oka K, Ishimura-Oka K, Chu MJ, et al. Mouse very-low-density-lipoprotein receptor (VLDLR) cDNA cloning, tissue-specific expression and evolutionary relationship with the low-density-lipoprotein receptor. *Eur. J. Biochem.* Sep 15 1994;224(3):975-982.
299. Wyne KL, Pathak K, Seabra MC, Hobbs HH. Expression of the VLDL receptor in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* Mar 1996;16(3):407-415.
300. Labonte P, Begley S, Guevin C, et al. PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology.* Jul 2009;50(1):17-24.
301. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science.* Oct 30 1998;282(5390):938-941.
302. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* Oct 1 2002;21(19):5017-5025.
303. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Oct 26 1999;96(22):12766-12771.
304. Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, et al. The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J. Virol.* Apr 2008;82(7):3555-3560.
305. Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J. Virol.* Feb 2009;83(4):2011-2014.
306. Lopez S, Bermudez B, Abia R, Muriana FJ. The influence of major dietary fatty acids on insulin secretion and action. *Curr. Opin. Lipidol.* Feb 2009;21(1):15-20.
307. Roehrich ME, Mooser V, Lenain V, et al. Insulin-secreting beta-cell dysfunction induced by human lipoproteins. *J. Biol. Chem.* May 16 2003;278(20):18368-18375.
308. Langhi C, Le May C, Gmyr V, et al. PCSK9 is expressed in pancreatic delta-cells and does not alter insulin secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Dec 25 2009;390(4):1288-1293.
309. Roux A, Uyhazi K, Frost A, De Camilli P. GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature.* May 25 2006;441(7092):528-531.
310. Praefcke GJ, McMahon HT. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol.* Feb 2004;5(2):133-147.
311. Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell.* Jun 2006;10(6):839-850.

312. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. Feb 11 1994;263(5148):802-805.
313. Poupon V, Girard M, Legendre-Guillemin V, et al. Clathrin light chains function in mannose phosphate receptor trafficking via regulation of actin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Jan 8 2008;105(1):168-173.
314. De Matteis MA, Luini A. Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Apr 2008;9(4):273-284.
315. Wilbur JD, Hwang PK, Ybe JA, et al. Conformation switching of clathrin light chain regulates clathrin lattice assembly. *Dev Cell.* May 18 2010;18(5):841-848.
316. Fotin A, Cheng Y, Sliz P, et al. Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature*. Dec 2 2004;432(7017):573-579.
317. Engqvist-Goldstein AE, Warren RA, Kessels MM, Keen JH, Heuser J, Drubin DG. The actin-binding protein Hip1R associates with clathrin during early stages of endocytosis and promotes clathrin assembly in vitro. *J. Cell Biol.* Sep 17 2001;154(6):1209-1223.
318. Bennett EM, Chen CY, Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG, Brodsky FM. Clathrin hub expression dissociates the actin-binding protein Hip1R from coated pits and disrupts their alignment with the actin cytoskeleton. *Traffic*. Nov 2001;2(11):851-858.
319. Legendre-Guillemin V, Metzler M, Charbonneau M, et al. HIP1 and HIP12 display differential binding to F-actin, AP2, and clathrin. Identification of a novel interaction with clathrin light chain. *J. Biol. Chem.* May 31 2002;277(22):19897-19904.
320. Wilbur JD, Chen CY, Manalo V, Hwang PK, Fletterick RJ, Brodsky FM. Actin binding by Hip1 (huntingtin-interacting protein 1) and Hip1R (Hip1-related protein) is regulated by clathrin light chain. *J. Biol. Chem.* Nov 21 2008;283(47):32870-32879.
321. Vilaro S, Llobera M. Uptake and metabolism of Intralipid by rat liver: an electron-microscopic study. *J. Nutr.* Aug 1988;118(8):932-940.
322. Musunuru K, Strong A, Frank-Kamenetsky M, et al. From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature*. Aug 5 2010;466(7307):714-719.
323. Kjolby M, Andersen OM, Breiderhoff T, et al. Sort1, encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. *Cell Metab.* Sep 8 2010;12(3):213-223.
324. Bulina ME, Lukyanov KA, Britanova OV, Onichtchouk D, Lukyanov S, Chudakov DM. Chromophore-assisted light inactivation (CALI) using the phototoxic fluorescent protein KillerRed. *Nat Protoc.* 2006;1(2):947-953.
325. Jacobson K, Rajfur Z, Vitriol E, Hahn K. Chromophore-assisted laser inactivation in cell biology. *Trends Cell Biol.* Sep 2008;18(9):443-450.

326. Wang Y, Shyy JY, Chien S. Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: seeing is believing. *Annu Rev Biomed Eng.* 2008;10:1-38.
327. Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, Dikic I. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol.* May 2003;5(5):461-466.
328. Raiborg C, Rusten TE, Stenmark H. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* Aug 2003;15(4):446-455.
329. d'Azzo A, Bongiovanni A, Nastasi T. E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation. *Traffic.* Jun 2005;6(6):429-441.
330. Treier M, Staszewski LM, Bohmann D. Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell.* Sep 9 1994;78(5):787-798.
331. Duval M, Bedard-Goulet S, Delisle C, Gratton JP. Vascular endothelial growth factor-dependent down-regulation of Flk-1/KDR involves Cbl-mediated ubiquitination. Consequences on nitric oxide production from endothelial cells. *J Biol Chem.* May 30 2003;278(22):20091-20097.
332. Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science.* Jul 3 2009;325(5936):100-104.
333. Hong C, Duit S, Jalonon P, et al. The E3 ubiquitin ligase IDOL induces the degradation of the low density lipoprotein receptor family members VLDLR and ApoER2. *J. Biol. Chem.* Jun 25 2010;285(26):19720-19726.
334. Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J. Biol. Chem.* Aug 19 1994;269(33):21191-21197.
335. Cesarman GM, Guevara CA, Hajjar KA. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *J. Biol. Chem.* Aug 19 1994;269(33):21198-21203.
336. Fowler DM, Araya CL, Fleishman SJ, et al. High-resolution mapping of protein sequence-function relationships. *Nat Methods.* Sep 2010;7(9):741-746.
337. Ding K, McDonough SJ, Kullo IJ. Evidence for positive selection in the C-terminal domain of the cholesterol metabolism gene PCSK9 based on phylogenetic analysis in 14 primate species. *PLoS One.* 2007;2(10):e1098.
338. Mayer G, Poirier S, Seidah NG. Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels. *J. Biol. Chem.* Nov 14 2008;283(46):31791-31801.

ANNEXE 1

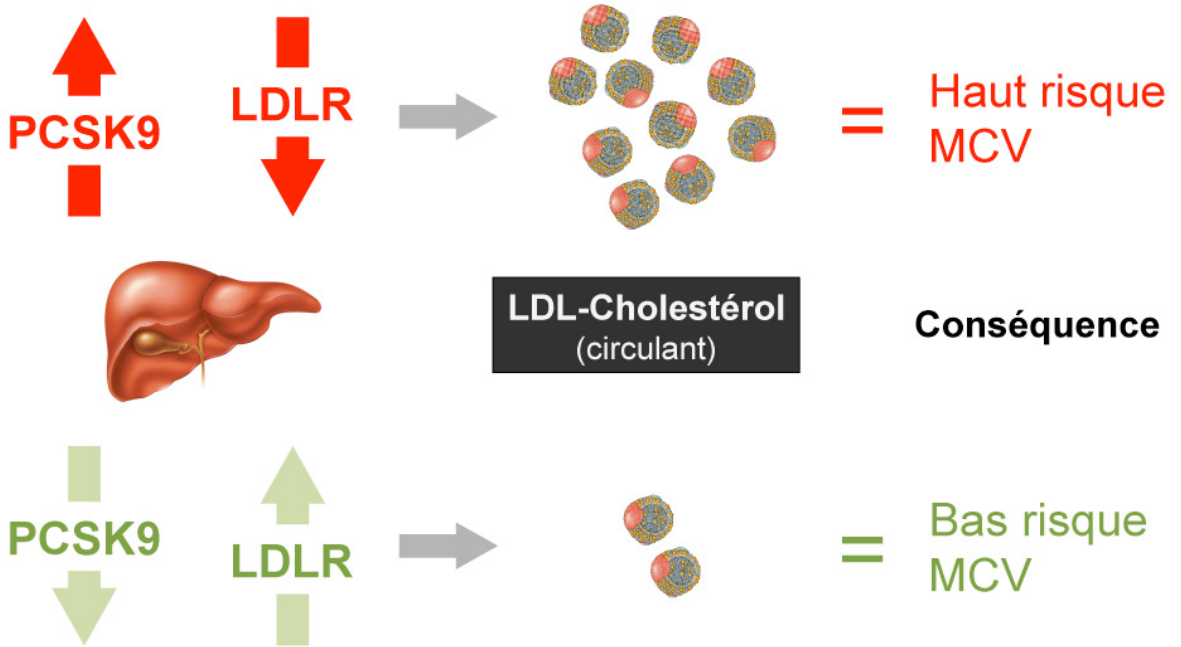


Figure 17 Interrelation entre PCSK9 et les MCV. Ce schéma illustre la corrélation entre le taux de PCSK9 dans le foie l'effet sur le LDL-Cholestérol circulant. Plus il y a de PCSK9 (gain-de-fonction ou surabondance), plus il y a de dégradation du LDLR et donc accumulation particules LDL-cholestérol et *vice versa*. La présence de PCSK9 est directement corrélée avec le risque de développement de maladies cardiovasculaires.

ANNEXE 2

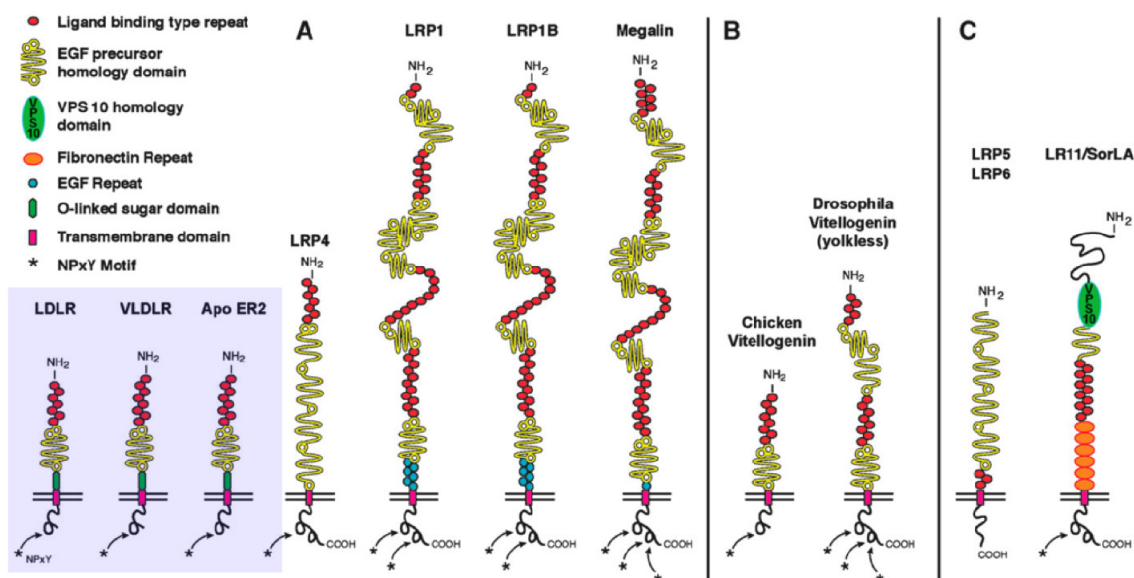


Figure 18 Membres de la famille du LDLR. Homologie entre les récepteurs de la famille du LDLR ainsi que les différents domaines constitutifs.

(Source: Modifiée de Herz J. et coll.²⁶⁸)

ANNEXE 3

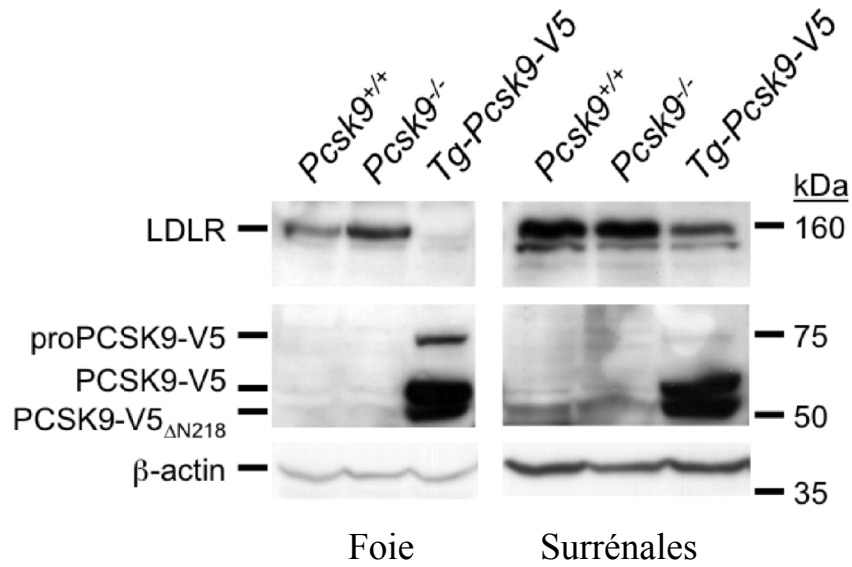


Figure 19 Effet de PCSK9 sur la dégradation du LDLR dans le foie et les surrénales. Par immunobuvardage, les niveaux du LDLR, PCSK9-V5 et actine furent analysés pour les souris de type sauvage (*Pcsk9*^{+/+}), déficientes (*Pcsk9*^{-/-}) et surexprimant PCSK9 dans les hépatocytes (*Tg-Pcsk9-V5*; étiquette V5). Un total de 75 µg de protéines comprenant trois extraits d'animaux différents (3 X 25 µg) est représenté par génotype par tissu.

ANNEXE 4

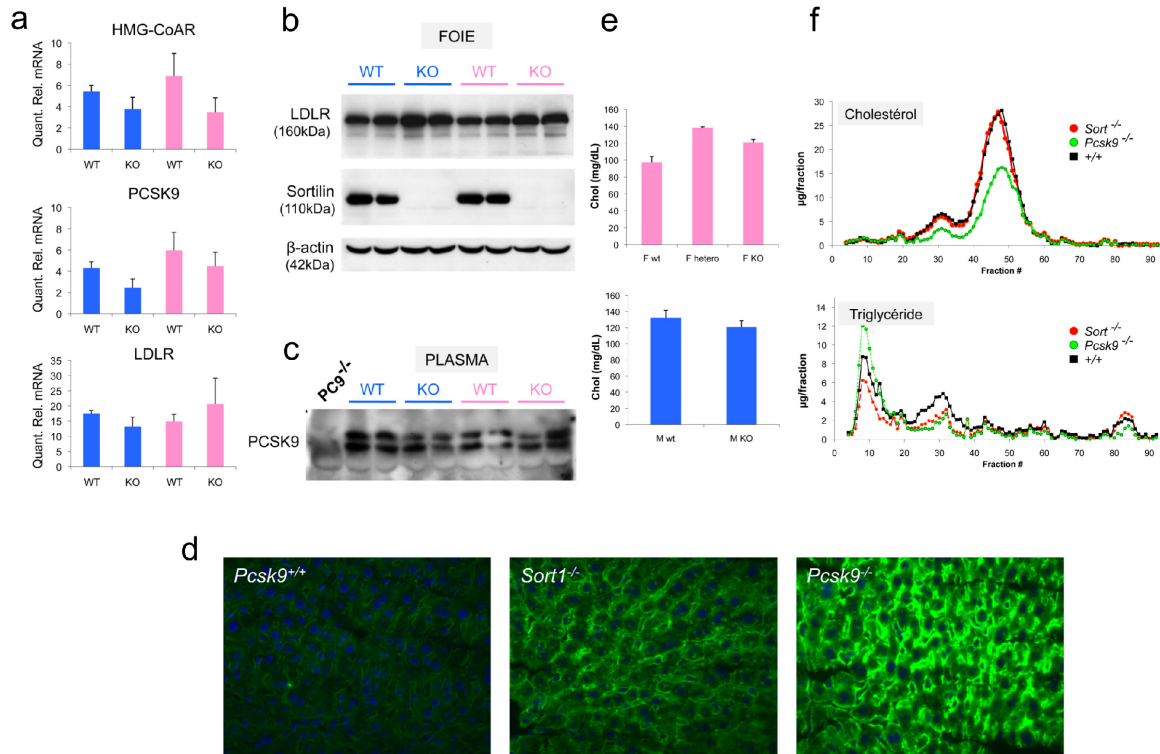


Figure 20 Analyses des facteurs cholestérogéniques dans les souris déficientes pour la sortiline (*Sort1*^{-/-}). Toutes les analyses regroupent deux souris âgées de 5 semaines maintenues sur une diète de type « *chow* » par sexe et par génotype (type sauvage; *+/+* et WT, déficientes pour le sortiline; *Sort1*^{-/-} et KO, déficiente pour la PCSK9; *Pcsk9*^{-/-}) (a) Quantité relative de l'abondance des ARN messagers pour les gènes cholestérogéniques HMG-CoAR, PCSK9 et LDLR fut déterminé par PCR en temps réel et normalisée à l'aide du messageur du gène ribosomal S16. (b) Analyses par immunobuvardage des niveaux protéiques du LDLR et de la sortiline dans les extraits de foie. (c) Analyses par immunoprécipitation suivi d'immunobuvardage des niveaux de PCSK9 dans le plasma de souris selon le génotype. La spécificité de la réaction fut déterminée à l'aide de plasma de souris déficientes pour la PCSK9 (*Pcsk9*^{-/-}). (d) Immunohistochimie du LDLR à la surface des hépatocytes selon le génotype. (e) Quantification par densitométrie de la concentration de cholestérol totale plasmatique par sexe et par génotype. (f) Profils lipidiques (cholestérol et triglycérides) analysés par HPLC (séparation des fractions correspondant aux type de particules soit VLDL, LDL et HDL, voir Chapitre I, Fig.7) par génotype. Seulement les profils de souris mâles sont représentés à titre de simplification. Les mâles (M, bleu) et les femelles (F, rose) sont représentés. Barres d'erreurs furent calculés à partir du test de « *student* » contenant deux échantillons biologiques/génotype/sexe analysés en duplicata.

ANNEXE 5

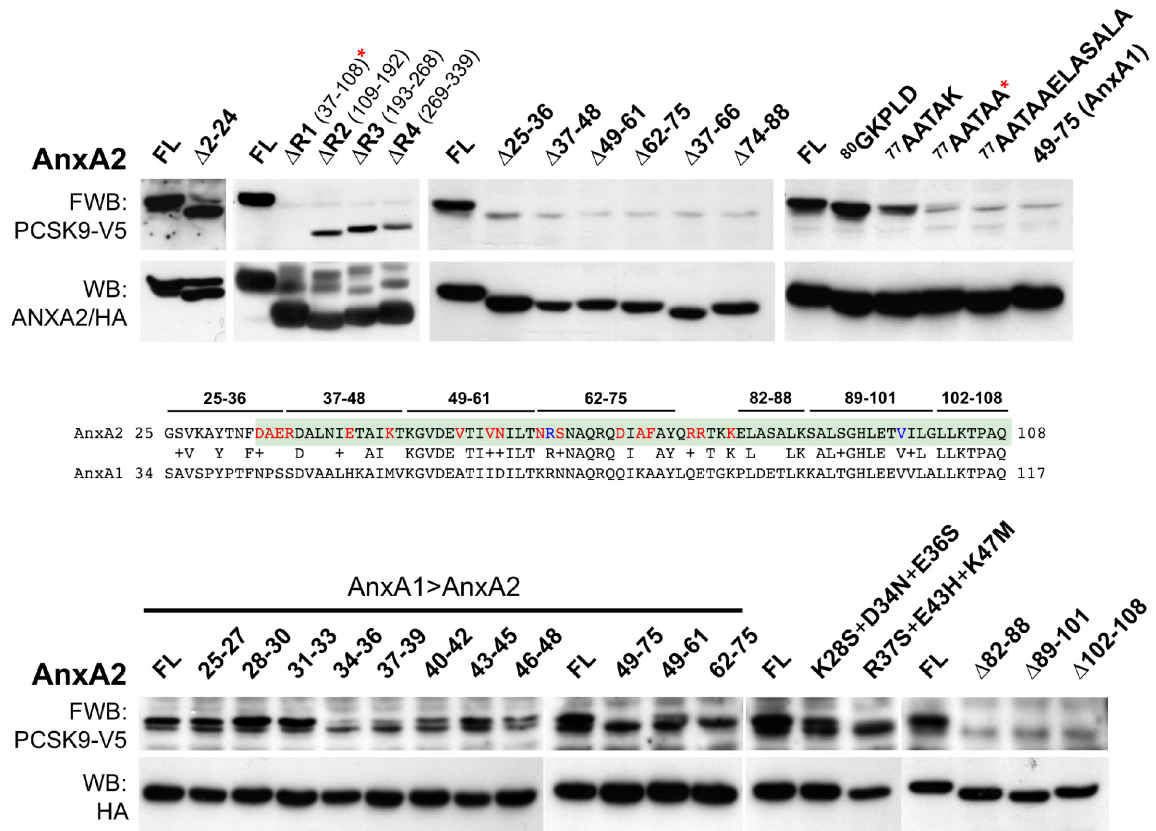


Figure 21 Caractérisation des résidus importants dans la liaison de PCSK9 à l'Annexine A2. Basé sur l'alignement de séquences entre l'AnxA1 et AnxA2 (représenté au centre), plusieurs constructions d'ADN furent générés par mutagenèse dirigées afin de soit retirer des résidus (Δ), retirer des charges (⁸⁰GKPLD, ⁷⁷AATAK, ⁷⁷AATAA, ⁷⁷AATAAELASALA ou interchangés pour les résidus correspondants à l'AnxA1 (49-75 (AnxA1), K28S+D34N+E36S, R37S+E43H+K47M, AnxA1>AnxA2. Les différents plasmides encodant pour les mutations sélectionnées furent transfectées dans les cellules HEK293. Les extraits protéiques furent déposés sur un gel d'acrylamide et transférés sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes furent ensuite incubées avec du milieu conditionné contenant de la PCSK9 produit à partir des HEK293. Suite à l'incubation (immunobuvardage d'affinité), l'attachement de PCSK9 fut révélé par l'étiquette V5 fusionnée en région C-terminal de la PCSK9. L'expression des différentes constructions d'ADN pour l'AnxA2 fut aussi analysée à partir de l'étiquette HA (hémagglutinine d'influenza) servant de normalisateur. FL représente la forme complète de l'AnxA2 (contrôle positif). Les résidus importants sont illustrés en rouge dans la séquence minimal requise pour la liaison de PCSK9 à l'AnxA2 (surligné en vert).

ANNEXE 6

SP-³⁰YTNFDAERDALNIETAIKTKGVDEVITIVNILTNRNSNAQRQDIAFAYQRRTKKELASALKSALSGHLETIVLGLLKTPAQ¹⁰⁸-HA-KDEL

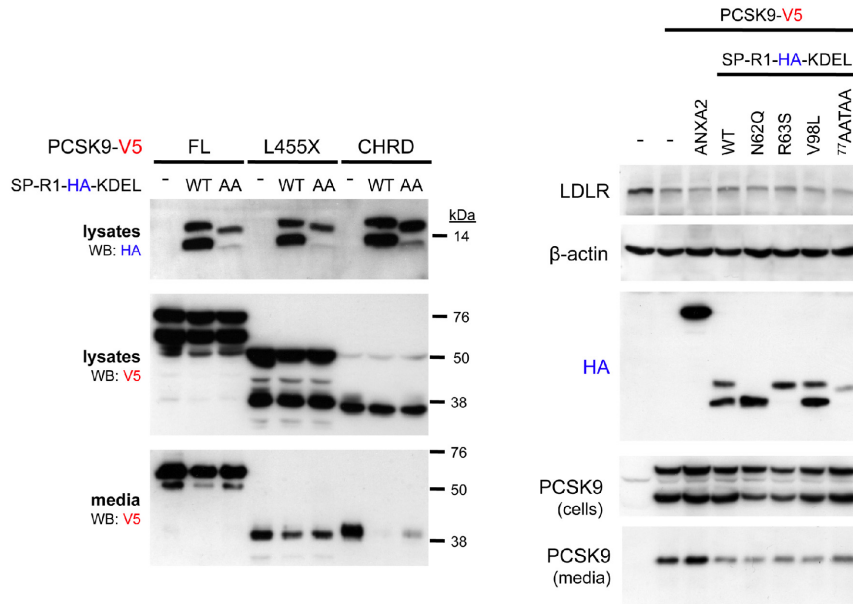


Figure 22 Effet de la rétention du peptide R1 de l'AnxA2 dans le réticulum endoplasmique sur la sécrétion de PCSK9. À partir du plasmide pIRES, nous avons généré une construction d'ADN où le domaine R1 de l'AnxA2 (résidus 30 à 108) fut fusionné en N-terminal avec le peptide signal de PCSK9 (pour permettre son incorporation artificielle dans la voie de sécrétion) et en séquentiellement en C-terminal avec l'étiquette HA et le peptide « KDEL » (provoque une rétention artificielle dans le réticulum endoplasmique. Séquence peptidique est représentée. Certaines mutations critiques pour la liaison de PCSK9 au domaine R1 de l'AnxA2 furent aussi introduites par mutagenèse dirigée (N62Q, R63S, V98L, ⁷⁷AATAA, voir Fig. 16 et 21). Dans les cellules HEK293, les différentes constructions (vecteur vide, forme de type sauvage (WT) et ⁷⁷AATAA (AA) furent d'abord cotransfectées avec différentes formes de PCSK9 (FL, forme complète; L455X, sans le domaine CHRD, CHRD seul; gauche). Ensuite, PCSK9 (forme complète) fut cotransfecté avec un vecteur vide (-), la forme complète (cytosolique) de l'AnxA2 (ANXA2) et les formes SP-R1-HA-KDEL respectives. Par immunobuvardage, les niveaux protéiques des différentes constructions d'AnxA2 (anti-HA), PCSK9 (cellules; *lysates* et milieux; *media*; anti-V5), ainsi que les niveaux endogènes du LDLR furent analysés. À noter, qu'en présence de SP-R1-AnxA2-KDEL, il y a rétention de PCSK9 dans la cellule illustré par une réduction de sécrétion de PCSK9. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

STEVE POIRIER

IRCM
110 Ave. des Pins Ouest
Montréal, Qc., Canada
H2W 1R7

T 514.987.5559
F 514.987.5542

ÉDUCATION**2006-2010 Ph.D. Biologie Moléculaire**

Faculté de Médecine, Université de Montréal.
Sous la direction du Dr. Nabil G. Seidah, Institut de Recherches Cliniques de Montréal. Thèse: *Dégradation des membres de la famille du LDLR par la convertase PCSK9: Troisième locus de l'hypercholestérolémie familiale*, 262p.

2003-2006 M.Sc. Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine, Université de Montréal.
Sous la direction du Dr. Nabil G. Seidah, Institut de Recherches Cliniques de Montréal. Mémoire: *Implication de la convertase NARC-1/PCSK9 au cours de la différenciation neuroectodermale*, 133p.

1999-2003 B.Sc. Biochimie

Département de Chimie et Biochimie, Université du Québec à Montréal.

PUBLICATIONS

- 1- Poirier S, Mayer G, Poupon V, McPherson PS, Day R, Duclos FJ, Parker R, Prat A, Seidah NG. *Dissection of the cellular pathways of PCSK9-induced Low density lipoprotein receptor degradation: Evidence for an intracellular route*. **J Biol Chem**, 2009; 284(42):28856-64.
- 2- Mayer G, Poirier S, Seidah NG. *Annexin A2 is a C-terminal PCSK9 binding protein that regulates endogenous LDLR levels*. **J Biol Chem**, 2008; 283(46):31791-801.

- 3- Poirier S. *Un troisième régulateur du mauvais cholestérol sanguin.* **Dire**, 2008; Vol.17, No.3, 50-53.
- 4- Seidah NG, Mayer G, Zaid A, Roussellet E, Nassoury N, Poirier S, Essalmani R, Prat A. *The activation and physiological functions of the proprotein convertases.* **Int J Biochem Cell Biol**, 2008; 40(6-7):1111-25.
- 5- Poirier S, Mayer G, Benjannet S, Bergeron E, Macinkiewicz J, Nassoury N, Mayer H, Nimpf J, Prat A, Seidah NG. *The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of the LDLR and its closest family members VLDLR and ApoER2.* **J Biol Chem**, 2008; 283(4):2363-72.
- 6- Poirier S, Prat A, Marcinkiewicz E, Paquin J, Chitramuthu BP, Baranowski D, Cadieux B, Bennett HP, Seidah NG. *Implication of the proprotein convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system.* **J Neurochem**, 2006; 98(3):838-50.

BREVET

Mayer G., Poirier S., Seidah NG. *PCSK9 INHIBITORS AND METHODS OF USE THEREOF.* World Intellectual Property Office (WIPO; Pub no.: WO/2009/143633; Int. App. no.: PCT/CA2009/000764). Int. filling date: 01/06/09, Pub. date: 03/12/09. (*Identification of human ANXA2 as a natural inhibitor of PCSK9-induced LDLR degradation*)

ACTE DE COLLOQUE ET COMPTE-RENDU DE CONFÉRENCES ET CONGRÈS

- 1- 11^e réunion annuelle de la Société Québécoise de Lipidologie, de Nutrition et de Métabolisme (SQLNM), Médecine Sciences, 2010.
- 2- Poirier S., Zaid A., Mayer G., Marcinkiewicz E., Benjannet S., Bergeron E., Mayer H., Nimpf J., Prat A., Seidah NG. Abstract 830: The Proprotein Convertase PCSK9 Induces The Degradation Of LDLR And Its Closest Family Members VLDLR And ApoER2. *Circulation*, 2007; 116: II_161.
- 3- 8^e réunion annuelle de la Société Québécoise de Lipidologie, de Nutrition et de Métabolisme (SQLNM), Médecine Sciences, 2007.

CONFÉRENCES

- 1- **21-24/10/10 : 35th Annual Canadian Lipoprotein Conference, Queen's landing, Niagara-on-the-lake, Ont., Canada.** Poirier S., Mayer G, Murphy SR, Chang TY, Schu P, Seidah NG. *Lysosomal sorting of NPC1 is mediated by the cytosolic adaptor AP-1A.* (comité de sélection)
- 2- **06/05/10: XVI^e Journée scientifique des programmes de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine; Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Canada.** Poirier S., Mayer G, Murphy SR, Chang TY, Schu P, Seidah NG. *The cytosolic adaptor AP-1A is essential for the trafficking and function of NPC1.* (comité de sélection)
- 3- **17/03/10: Séminaire en Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal; Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Canada.** Poirier S. *Dégradation des membres de la famille du LDLR par la convertase PCSK9: troisième locus de l'hypercholestérolémie familiale.*
- 4- **28/11/08: Annual retreat of the CIHR Team on "Secretory Proteinases in Cardiovascular Disorders"; Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Canada.** Poirier S., Mayer G., Poupon V., McPherson PS., Prat A., Seidah NG. *Dissection of the major cellular pathways for PCSK9-induced LDLR degradation.* (conférencier invité)
- 5- **12/10/08: Séminaire de l'Axe des maladies cardiovasculaires et métaboliques; Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Canada.** Poirier S., Mayer G., Poupon V., McPherson PS., Prat A., Seidah NG. *PCSK9: études cellulaires et humaines.* (conférencier invité)
- 6- **02/06/08: Journée de la recherche IRCM 2008; Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Canada.** Poirier S., Mayer G., Poupon V., McPherson PS., Prat A., Seidah NG. *Dissection of the major cellular pathways for PCSK9-induced LDLR degradation.* (comité de sélection)
- 7- **06/11/07: American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2007; Orange County Convention Center/Orlando, FL, USA.** Poirier S., Mayer G., Benjannet S., Bergeron E., Marcinkiewicz J., Nassoury N., Mayer H., Nimpf J., Prat A., Seidah NG. *The Proprotein Convertase PCSK9 Induces The Degradation Of LDLR And Its Closest Family Members VLDLR And ApoER2.* (American Heart Association Committee on Scientific Sessions Program)
- 8- **08/03/07: Journée de la recherche Simon-Pierre Noël; département de Biochimie, Université de Montréal, Canada.** Poirier S., Mayer G., Benjannet S.,

Bergeron E., Marcinkiewicz J., Nassoury N., Mayer H., Nimpf J., Prat A., Seidah NG. *Dégradation des membres de la famille du LDLR par la convertase PCSK9 impliquée dans l'hypercholestérolémie familiale de type 3 (FH3)*. (présentation devant jury; séminaire de recherche; évaluation par les pairs)

- 9- **18/01/05: Club Interlab; Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Canada.** Poirier S., Chamberland A., Paquin J., Prat A., Seidah NG. *Régulation des proprotéines convertases NARC-1, PC5, Furine, SKI-1 et PC2 au cours de la neurogenèse des cellules P19*. (présentation devant jury; séminaire de recherche)
- 10- **04/11/04: Retraite sur les proprotéines convertases; centre de Congrès NAV Canada; Cornwall, Ontario, Canada.** Poirier S., Chamberland A., Paquin J., Prat A., Seidah NG. *Regulation of NARC-1, PC5, Furin, SKI-1 and PC2 during neurogenesis of P19 cells*. (conférencier invité)
- 11- **08/01/03: Stages de Biochimie CHM5011; UQÀM, Montréal, Canada.** Poirier S., Boily MH., Spear PA., Paquin J. *Métabolisme de l'acide rétinoïque dans le modèle P19 de différenciation cellulaire*. (présentation devant jury; séminaire de recherche)
- 12- **Réunion laboratoire;** séminaires trimestrielles de travaux en cours devant les membres du laboratoire (~20 chercheurs) et scientifiques externes invités et participation aux discussions des résultats d'autrui (hebdomadaire).
- 13- **Club de lecture;** présentations trimestrielles, critique et discussion (hebdomadaire) avec les membres du laboratoire (~20 chercheurs) et scientifiques externes invités sur des articles scientifiques jugés pertinents et d'actualité.

PRÉSENTATIONS PAR AFFICHES ET COMMUNICATIONS

- 1- **29-01/04-05/10: 11^e réunion annuelle de la Société québécoise de lipidologie, de nutrition et de métabolisme (SQLNM); Château Bonne Entente, Québec, Canada.** Poirier S., Mayer G, Murphy SR, Chang TY, Schu P, Seidah NG. *Le complexe cytosolique AP-1A est essentiel pour l'efflux lysosomal du LDL-cholestérol*. (comité de sélection)
- 2- **08-10/04/10: Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (ATVB) 2010 Scientific Sessions, San Francisco, CA, USA.** Poirier S., Mayer G, Murphy SR, Chang TY, Schu P, Seidah NG. *The Cytosolic Adaptor AP-1A Is a Critical Element in Vesicular Trafficking of LDL-Derived Cholesterol*. (American Heart Association Committee)

- 3- **02-04/06/09: Canadian Student Health Research Forum, CIHR National Poster Competition; University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada.** Poirier S, Mayer G, Poupon V, McPherson PS, Day R, Duclos FJ, Parker R, Prat A, Seidah NG. *Dissection of the cellular pathways for PCSK9-induced LDLR degradation.* (comité de sélection; sur invitation)
- 4- **08/05/09: XV^e Journée scientifique des programmes de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine; Université de Montréal, Canada.** Poirier S, Mayer G, Poupon V, McPherson PS, Day R, Duclos FJ, Parker R, Prat A, Seidah NG. *Dissection of the cellular pathways for PCSK9-induced LDLR degradation.*
- 5- **03-06/03/09: Deuel Conference on Lipids; Borrego Springs, CA, USA.** Seidah NG, Roubstova A, Mayer G, Poirier S, Hajjar KA, Prat A. Insights into the hepatic and extrahepatic function and regulation of PCSK9. (communication)
- 6- **16/12/08: 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (ASCB); Moscone Center, San Francisco, CA, USA.** Poirier S, Mayer G, Poupon V, McPherson PS, Prat A, Seidah NG. *Dissection of the major cellular pathways for PCSK9-induced LDLR degradation.*
- 7- **28/11/08: Annual retreat of the CIHR Team on “Secretory Proteinases in Cardiovascular Disorders”; Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Canada.** Mayer G., Poirier S, Hajjar K, Seidah NG. *The PCSK9-mediated LDL receptor degradation in mouse intestine and adrenals is inhibited by endogenous annexin A2.* (communication)
- 8- **03-05/10/08: Canadian Lipoprotein Conference 2008; Fairmont Chateau Whistler, BC, Canada.** Poirier S, Mayer G., Poupon V., McPherson PS., Prat A., Seidah NG. *Dissection of the major cellular pathways for PCSK9-induced LDLR degradation.* (comité de sélection)
- 9- **03-05/10/08: Canadian Lipoprotein Conference 2008; Fairmont Chateau Whistler, BC, Canada.** Mayer G, Poirier S, Seidah NG. *Annexin A2 is a C-terminal PCSK9 binding that regulates endogenous LDLR levels.* (communication)
- 10- **13-18/07/08: Gordon Research Conferences Proprotein Processing, Trafficking & Secretion; Colby-Sawyer College, New London, NH, USA.** Mayer G, Poirier S, Seidah NG. *Identification of annexin A2 as a C-terminal PCSK9 binding protein and its regulation of endogenous LDLR levels.* (communication, congrès international sur les proprotéines convertases)
- 11- **25/04/08: XIV^e Journée scientifique des programmes de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine; Université de Montréal, Canada.** Poirier S, Mayer G.,

Poupon V., McPherson PS., Prat A., Seidah NG. *Dissection of the major cellular pathways for PCSK9-induced LDLR degradation.*

- 12- 11-13/06/07: The Montreal Cell, Molecular and Developmental Biology Research Retreat; Mont-Gabriel, Saint-Adèle, Canada.** Poirier S., Mayer G., Benjannet S., Bergeron E., Marcinkiewicz J., Nassoury N., Mayer H., Nimpf J., Prat A., Seidah NG. *The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of LDLR and its closest family members VLDLR And ApoER2.*
- 13- 04/06/07: Journée de la Recherche IRCM 2007; Institut de Recherches cliniques de Montréal (IRCM), Canada.** Poirier S., Mayer G., Benjannet S., Bergeron E., Marcinkiewicz J., Nassoury N., Mayer H., Nimpf J., Prat A., Seidah NG. *The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of LDLR and its closest family members VLDLR And ApoER2.*
- 14- 03-05/05/07: 8^e réunion annuelle de la Société québécoise de lipidologie, de nutrition et de métabolisme (SQLNM); Hôtel Sheraton, Laval, Canada.** Poirier S., Mayer G., Benjannet S., Bergeron E., Marcinkiewicz J., Nassoury N., Mayer H., Nimpf J., Prat A., Seidah NG. *The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of LDLR and its closest family members VLDLR And ApoER2.*
- 15- 02/05/07: XIII^e Journée scientifique des programmes de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine; Université de Montréal, Canada.** Poirier S., Mayer G., Benjannet S., Bergeron E., Marcinkiewicz J., Nassoury N., Mayer H., Nimpf J., Prat A., Seidah NG. *The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of LDLR and its closest family members VLDLR And ApoER2.*
- 16- 09-14/07/06: Gordon Research Conferences Proprotein Processing, Trafficking & Secretion; Colby-Sawyer College, New London, NH, USA.** Poirier S., Prat A., Marcinkiewicz E., Paquin J., Chitramuthu BP., Baranowski D., Cadieux B., Bennett HP., Seidah NG. *Degradation of the LDLR family members by PCSK9, a proprotein convertase involved in familial dyslipidemia and CNS development.* (congrès international sur les proprotéines convertases)
- 17- 12/06/06: Journée de la Recherche IRCM 2006; Institut de Recherches cliniques de Montréal (IRCM), Canada.** Poirier S., Prat A., Marcinkiewicz E., Paquin J., Chitramuthu BP., Baranowski D., Cadieux B., Bennett HP., Seidah NG. *Degradation of the LDLR family members by PCSK9, a proprotein convertase involved in familial dyslipidemia and CNS development.*
- 18- 28/04/06: XII^e Journée scientifique des programmes de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine; Université de Montréal, Canada.** Poirier S., Zaid A., Marcinkiewicz E., Prat A., Seidah NG. *Dégradation des membres de la famille du LDLR par la convertase de proprotéines PCSK9 impliquée dans l'hypercholestérolémie familiale de type 3 (FH3).*

- 19- 27/09/04: X^e Journée scientifique des programmes de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine; Université de Montréal, Canada. Poirier S., Chamberland A., Paquin J., Prat A., Seidah NG. *Regulation of neural apoptosis regulated convertase 1 (NARC-1/PCSK9) during neurogenesis in P19 cells.*
- 20- 11-16/07/04: Gordon Research Conferences Proprotein Processing, Trafficking & Secretion; Colby-Sawyer College, New London, NH, USA. Poirier S., Chamberland A., Paquin J., Prat A., Seidah NG. *Regulation of neural apoptosis regulated convertase 1 (NARC-1/PCSK9) during neurogenesis in P19 cells.* (congrès international sur les proprotéines convertases)

BOURSES

- 1- 04/08: Bourse d'études supérieures du Canada Frederick Banting et Charles Best - Bourse au doctorat; IRSC: Les Instituts de Recherche en Santé du Canada. (examen par les pairs; \$87 500 CAD)
- 2- 04/08: Bourse de Formation de doctorat; FRSQ: Fonds de la Recherche en Santé du Québec. (examen par les pairs; \$60 000 CAD, *déclinée*)
- 3- 04/08: Bourse de Recherche au doctorat; FMCC: Fondation des Maladies du Cœur du Canada. (examen par les pairs; \$44 000 CAD, *déclinée*)
- 4- 06/07: Bourse André Caillé; IRCM: Institut de Recherches Cliniques de Montréal. (examen par les pairs; 18 000\$ CAD)
- 5- 15/05/07: Bourse de participation à des congrès internationaux; département Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal. (examen par les pairs; 1000\$ CAD)
- 6- 7-23/02/07: Bourse des programmes de Biologie Moléculaire pour étudiant au doctorat, Faculté de Médecine; Université de Montréal. (examen par les pairs; \$ 6 000 CAD)
- 7- 01/06-08/2002: Bourse de la fondation de l'UQÀM; département de chimie biochimie de l'Université du Québec à Montréal, UQÀM. (examen par les pairs; \$2 000 CAD)

PRIX ET DISTINCTIONS

- 1- **06/05/10: Prix des programmes de Biologie Moléculaire, présentation orale;** XVI^e Journée scientifique des programmes de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal. (présentation devant jury; évaluation par les pairs; 500\$ CAD)
- 2- **04/06/09: CIHR poster presentation Honorable Mention Award;** Canadian Student Health Research Forum, CIHR National Poster Competition; University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada. (présentation devant jury; évaluation par les pairs)
- 3- **08/05/09: Prix Borden-Ladner-Gervais;** XV^e Journée scientifique de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Canada. (comité d'évaluation; 500\$ CAD)
- 4- **07/05/09: Prix Olive-Beaudry-Leriché;** Faculté de Médecine, Université de Montréal, Canada. Sélectionné pour représenter l'Université de Montréal au « *Canadian Student Health Research Forum, CIHR National Poster Competition* »; University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada. (comité de sélection ; 500\$ CAD)
- 5- **11-13/06/07: Highly recommended poster award;** The Montreal Cell, Molecular and Developmental Biology Research Retreat, Mont-Gabriel, Saint-Adèle, Canada. (présentation devant jury; évaluation par les pairs)
- 6- **05/05/07: Prix Astra Zeneca;** 8^e réunion annuelle de la Société québécoise de lipidologie, de nutrition et de métabolisme (SQLNM), Hôtel Sheraton, Laval, Canada. (présentation devant jury; évaluation par les pairs; 1000\$ CAD)
- 7- **02/05/07: Prix de la Faculté des études supérieures (FES) de l'Université de Montréal;** XIII^e Journée scientifique des programmes de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal. (présentation devant jury; évaluation par les pairs; 500\$ CAD)
- 8- **09-14/07/06: Prix Gordon Research Conferences Proprotein Processing, Trafficking & Secretion;** Colby-Sawyer College; New London, NH, USA. (présentation devant jury; évaluation par les pairs; \$200 USD)
- 9- **27/09/04: Prix Astra Zeneca;** X^e Journée scientifique des programmes de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal. (présentation devant jury; évaluation par les pairs; \$750 CAD)

10- 11-16/07/04: Prix Gordon Research Conferences Proprotein Processing, Trafficking & Secretion; Colby-Sawyer College; New London, NH, USA. (présentation devant jury; évaluation par les pairs; \$650 USD)

DOSSIER DE PRESSE

Une voie intracellulaire importante pour le contrôle du mauvais cholestérol. (Octobre 2009)

<http://www.nouvelles.umontreal.ca/recherche/sciences-de-la-sante/une-voie-intracellulaire-importante-pour-le-controle-du-mauvais-cholesterol.html>

<http://www.ircm.qc.ca/en/nouvelles/statique/nouvelle242.html>

http://www.guidesanteenligne.com/news_detail.asp?ID=120808

Percée en recherche sur le cholestérol. (Novembre 2008)

Journal Forum, Université de Montréal, Vol. 43, No.17, p.12.

<http://www.nouvelles.umontreal.ca/udem-news/news-digest/a-new-weapon-in-the-fight-against-cholesterol.html>

<http://www.ircm.qc.ca/en/nouvelles/statique/nouvelle198.html>

http://www.eurekalert.org/pub_releases/2008-11/idrc-asb112408.php

<http://www.sciencedaily.com/releases/2008/11/081124130953.htm>

MEMBERSHIPS

- Membre de la Société québécoise de lipidologie, de nutrition et de métabolisme (SQLNM)
- Professional member of the American Heart Association and American Stroke Association (AHA/ASA)
- Member of the American Society for Cell Biology (ASCB)

