

Université de Montréal

**La PCSK9 humaine: une molécule aux multiples facettes
métaboliques et une cible thérapeutique prometteuse**
Études de régulation *in vitro* et *in vivo*

par

Geneviève Dubuc

Institut de recherches cliniques de Montréal

Groupe de recherche sur les hyperlipidémies et l'athérosclérose

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

Septembre 2010

© Geneviève Dubuc, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

La PCSK9 humaine: une molécule aux multiples facettes métaboliques et une cible
thérapeutique prometteuse
Études de régulation *in vitro* et *in vivo*

présentée par :
Geneviève Dubuc

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Patrick Du Souich, président-rapporteur
Dr Jean Davignon, directeur de recherche
Nabil G. Seidah, co-directeur
Claude Lazure, membre du jury
Louise Brissette, examinateur externe
Irène Strychar, représentante du doyen de la FES

Résumé

La proprotéine convertase subtilisine/kexine-9 (PCSK9) a été identifiée comme le troisième locus impliqué dans l'hypercholestérolémie autosome dominante (ADH). Les deux autres gènes impliqués dans l'ADH encodent le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDLR) et l'apolipoprotéine B. La PCSK9 est une convertase qui favorise la dégradation du LDLR dans les hépatocytes et augmente le niveau plasmatique de cholestérol des LDL (LDL-C). Les mutations « gain de fonction » de la PCSK9 sont associées à un phénotype d'hypercholestérolémie familiale, tandis que les variantes « perte de fonction » sont associées à un LDL-C réduit et à un risque coronarien plus faible.

Pour élucider le rôle physiologique de la PCSK9, nous avons étudié sa régulation génique. En utilisant le RT-PCR quantitatif dans des hépatocytes humains, nous avons analysé la régulation de PCSK9 sous différentes conditions modulant l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. Nous avons démontré que l'expression de la PCSK9 était induite par les statines de manière dose-dépendante et que cette induction était abolie par le mévalonate. De plus, le promoteur de *PCSK9* contenait deux motifs conservés pour la régulation par le cholestérol : le *sterol regulatory element* (SRE) et un site Sp1. La PCSK9 circule dans le plasma sous des formes mature et clivée par la furine. Grâce à notre anticorps polyclonal, nous avons mis au point un test ELISA mesurant la PCSK9 plasmatique totale. Une étude transversale a évalué les concentrations plasmatiques de PCSK9 chez des sujets sains et hypercholestérolémiques, traités ou non par des statines ou une combinaison statine/ezetimibe. Chez 254 sujets sains, la valeur moyenne de PCSK9 (écart-type) était de 89,5 (31,9) µg/L. La concentration plasmatique de la PCSK9 corrélait avec celle de cholestérol total, du LDL-C, des triglycérides (TG), de la glycémie à jeun, l'âge et l'indice de masse corporelle. Le séquençage de *PCSK9* chez des sujets aux extrêmes de la distribution des concentrations de PCSK9 de notre cohorte a révélé la présence d'une nouvelle variation « perte de fonction » : R434W. Chez 200 patients hypercholestérolémiques, la concentration de PCSK9 était plus élevée que chez les

sujets sains ($P < 0,04$). Elle a augmenté avec une dose croissante de statine ($P < 0,001$), et a augmenté encore plus suite à l'ajout d'ezetimibe ($P < 0,001$). Chez les patients traités, ceux présentant une hypercholestérolémie familiale (HF; due à une mutation du *LDLR*) avaient des concentrations plus élevées de PCSK9 que les non-HF ($P < 0,005$), et la réduction de LDL-C corrélait positivement avec la concentration de PCSK9 atteinte de la même manière dans les deux sous-catégories ($P < 0,02$ et $P < 0,005$, respectivement). Par ailleurs, une incubation des cellules HepG2 (hépatocytes) et Caco-2 (entérocytes) avec de l'ezetimibe a provoqué une augmentation de l'ARNm de PCSK9 et de NPC1L1 de 1,5 à 2 fois ($P < 0,05$), mais aucune variation significative de PCSK9 sécrétée n'a été observée, suggérant que ces lignées cellulaires ne sont pas un modèle idéal.

Nous avons également mesuré le niveau de PCSK9 chez 1 739 Canadiens-français âgés de 9, 13 et 16 ans. La valeur moyenne (écart-type) de PCSK9 dans cette cohorte était de 84,7 (24,7) $\mu\text{g/L}$, légèrement plus basse que dans la cohorte d'adultes (89,5 (31,9) $\mu\text{g/L}$). Chez les garçons, la PCSK9 circulante diminuait avec l'âge, tandis que c'était l'inverse chez les filles. Il y avait des associations positives et significatives entre la PCSK9 et la glycémie à jeun, l'insulinémie, le HOMA-IR, et les paramètres lipidiques (TC, LDL-C, TG, HDL-C, apoAI et apoB). Dans l'analyse multivariée, une hausse de 10% de l'insulinémie à jeun était associée à une augmentation de 1 à 2% de PCSK9.

La régulation de *PCSK9* est typique de celle d'un gène impliqué dans le métabolisme des lipoprotéines et est probablement la cible du facteur de transcription «*sterol regulatory element-binding protein*» (SREBP-2). La concentration plasmatique de la PCSK9 est associée avec l'âge, le sexe, et de multiples marqueurs métaboliques chez les enfants et les adultes. La détection de la PCSK9 circulante chez les sujets HF et non-HF signifie que ce test ELISA spécifique à PCSK9 pourrait servir à suivre la réponse à la thérapie chez un grand éventail de sujets. PCSK9 semble être une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement de l'hypercholestérolémie et de la maladie cardiovasculaire.

Mots-clés : LDL-cholestérol, statines, ezetimibe, hypercholestérolémie, ELISA, maladie cardiovasculaire

Abstract

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) has been identified as the third locus implicated in autosomal dominant hypercholesterolemia (ADH). The two other known genes implicated in ADH encode the low-density lipoprotein receptor (LDLR) and apolipoprotein B. PCSK9 is a protein convertase that post-translationally promotes the degradation of the LDLR in hepatocytes and increases plasma LDL cholesterol concentration (LDL-C). Heterozygote “gain-of-function” mutations of PCSK9 are associated with the familial hypercholesterolemia phenotype, whereas “loss-of-function” variants are associated with reduced LDL-C concentrations and lower coronary risk.

As an approach toward the elucidation of the physiological role(s) of PCSK9, we studied its transcriptional regulation. Using quantitative RT-PCR, we assessed *PCSK9* regulation under conditions known to regulate genes involved in cholesterol metabolism in HepG2 cells and in human primary hepatocytes. We found that PCSK9 expression was strongly induced by statins in a dose-dependent manner and that this induction was efficiently reversed by mevalonate. The PCSK9 promoter contains two typical conserved motifs for cholesterol regulation: a sterol regulatory element (SRE) and an Sp1 site.

PCSK9 circulates in plasma as mature and furin-cleaved forms. A polyclonal antibody against human PCSK9 was used to develop an ELISA that measures total plasma PCSK9 rather than only the mature form. A cross-sectional study evaluated plasma levels in normal and hypercholesterolemic subjects treated or untreated with statins or statin plus ezetimibe. In 254 healthy subjects, the mean plasma PCSK9 (SD) concentration was 89 (32) $\mu\text{g/L}$. PCSK9 levels correlated positively with plasma cholesterol, LDL-C, triglycerides, fasting glucose, age and body mass index. Sequencing PCSK9 from subjects at the extremes of PCSK9 plasma distribution revealed a new loss-of-function R434W variant. In 200 hypercholesterolemic patients, circulating PCSK9 was higher than in controls ($P < 0.04$), increased with increasing statin dose ($P < 0.001$), and further increased

when ezetimibe was added ($P < 0.001$). In treated patients ($n = 139$), those with familial hypercholesterolemia (FH; due to *LDLR* gene mutations) had higher PCSK9 values than non-FH ($P < 0.005$), and LDL-C reduction correlated positively with achieved plasma PCSK9 levels to a similar extent in both subsets ($P < 0.02$ and $P < 0.005$, respectively). However, incubation with ezetimibe of HepG2 (hepatocytes) and Caco-2 (enterocytes) cells caused an increase in PCSK9 and NPC1L1 mRNA of 1.5 to 2-fold ($P < 0.05$), but no significant rise in PCSK9 protein secretion, suggesting that these transformed cells are not an ideal model.

We also studied PCSK9 levels in 1,739 French Canadian youth ages 9, 13, and 16 years old. The mean (SD) plasma PCSK9 concentration, measured by ELISA, was 84.7 (24.7) $\mu\text{g/L}$ in the cohort, slightly lower than in the adult cohort (89.5 (31.9) $\mu\text{g/L}$). In boys, plasma PCSK9 decreased with age, whereas the inverse was true for girls. There were significant positive associations between PCSK9 and fasting glucose, insulin, and HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance). In multivariable analysis, a 10% higher fasting insulin was associated with a 1%-2% higher PCSK9 in both sexes. There were also positive associations between PCSK9 and total cholesterol, LDL-C, and triglycerides, as well as with HDL-C and apolipoproteins A1 and B.

PCSK9 regulation is typical of that of the genes implicated in lipoprotein metabolism. *In vivo*, PCSK9 is probably a target of the transcription factor “sterol response element-binding protein” (SREBP)-2. The PCSK9 plasmatic concentration is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in youth and adult samples. The detection of circulating PCSK9 in both FH and non-FH subjects means that this PCSK9 ELISA test could be used to monitor response to therapy in a wide range of patients. PCSK9 seems to be a promising drug target in the treatment of hypercholesterolemia and coronary heart disease.

Keywords : LDL-cholesterol, statins, ezetimibe, hypercholesterolemia, ELISA, cardiovascular disease

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xv
Introduction.....	1
1. Métabolisme des lipoprotéines.....	4
1.1. Voie exogène.....	6
1.2. Voie endogène.....	6
1.3. Transport à rebours du cholestérol.....	8
2. Rôle primordial du LDLR.....	11
2.1. Famille LDLR.....	11
2.1.1. Identification du LDLR.....	11
2.1.2. Ligands physiologiques.....	11
2.1.3. Structure du LDLR.....	12
2.1.4. Famille du LDLR.....	13
2.2. Régulation du LDLR.....	14
2.3. Mécanisme de capture, d'endocytose et de recyclage.....	17
3. PCSK9.....	19
3.1. Découverte.....	19
3.2. Structure : gène et protéine.....	21
3.3. Expression tissulaire.....	24
3.4. Modèles tissulaires et animaux.....	26
3.5. Régulation de l'expression de PCSK9.....	27
3.6. Impact de PCSK9 sur le LDLR.....	29
3.6.1. Liaison au LDLR.....	30
3.6.2. Liaison de PCSK9 au VLDLR, à l'ApoER2 et à l'annexine A2.....	34
3.7. Site d'action de PCSK9 dans la cellule.....	37
4. L'hypercholestérolémie familiale : signes cliniques.....	39
4.1. Mutation du LDLR.....	41
4.1.1. Classes de mutations.....	43
4.2. Mutation de l'apolipoprotéine B-100.....	45
4.3. Mutation de PCSK9.....	45
4.4. Traitements.....	47
4.4.1. Statines.....	47
4.4.2. Fibrates.....	49
4.4.3. Ezetimibe.....	50
4.4.4. Acide nicotinique.....	50
4.4.5. Résines.....	51

4.4.6.	Phytostérols.....	52
4.4.7.	Autres traitements en développement.....	53
4.5.	Mutations « gain-de-fonction » de PCSK9 et hypercholestérolémie.....	58
4.5.1.	Mécanisme.....	58
4.5.2.	Présentation clinique.....	61
4.6.	Mutations « perte-de-fonction » de PCSK9 et hypocholestérolémie.....	65
4.6.1.	Mécanisme.....	65
4.6.2.	Présentation clinique.....	65
4.6.3.	Hypobêtalipoprotéïnémie.....	69
4.7.	Impact de PCSK9 sur la maladie cardio-vasculaire.....	70
5.	Concentrations plasmatiques de PCSK9 chez l'humain.....	72
5.1.	Détection.....	72
5.2.	Distribution dans la population.....	76
5.3.	Facteurs déterminant les concentrations plasmatiques de PCSK9.....	76
5.3.1.	Analyse de régression linéaire multivariée.....	76
5.3.2.	Sexe et ethnies.....	77
5.3.3.	Paramètres lipidiques.....	78
6.	Objectifs du projet.....	80
7.	Influence des statines et de l'ezetimibe sur l'expression génique de PCSK9 <i>in vitro</i>	81
7.1.	Les statines augmentent l'expression de PCSK9, le gène encodant la proprotéine convertase subtilisin-kexin type-9 impliquée dans l'hypercholestérolémie familiale.....	81
7.1.1.	Abstract.....	82
7.1.2.	Introduction.....	83
7.1.3.	Methods.....	84
7.1.4.	Results.....	87
7.1.5.	Discussion.....	94
7.1.6.	Acknowledgments.....	96
7.1.7.	References.....	96
7.2.	Les statines et l'ezetimibe modulent les niveaux plasmatiques de PCSK9.....	103
7.2.1.	Abstract.....	104
7.2.2.	Introduction.....	104
7.2.3.	Methods.....	106
7.2.4.	Results.....	108
7.2.5.	Discussion.....	112
7.2.6.	Acknowledgments.....	113
7.2.7.	References.....	114
7.2.8.	Discussion.....	117
8.	Quantification, distribution et association de certains facteurs métaboliques avec le niveau de PCSK9 plasmatique chez l'humain.....	120
8.1.	Une nouvelle méthode pour la mesure de la PCSK9 plasmatique totale – Applications cliniques.....	120
8.1.1.	Abstract.....	122

8.1.2.	Introduction.....	122
8.1.3.	Methods.....	125
8.1.4.	Results.....	128
8.1.5.	Discussion.....	138
8.1.6.	Acknowledgments.....	143
8.1.7.	References.....	144
8.1.8.	Supplemental Data.....	152
8.2.	La PCSK9 plasmatique est associée à l'âge, au genre et à plusieurs marqueurs métaboliques dans un échantillon représentatif d'enfants et d'adolescents.....	154
8.2.1.	Abstract.....	155
8.2.2.	Introduction.....	156
8.2.3.	Methods.....	157
8.2.4.	Results.....	161
8.2.5.	Discussion.....	165
8.2.6.	Acknowledgments.....	170
8.2.7.	References.....	171
8.2.8.	Supplemental Data.....	175
9.	Discussion et perspectives futures.....	180
9.1.	Résumé des résultats obtenus.....	180
9.1.1.	PCSK9 <i>in vitro</i>	180
9.1.2.	PCSK9 <i>in vivo</i> : ELISA.....	183
9.2.	Importance du diagnostic pour offrir un traitement approprié.....	187
9.3.	Études cliniques sur un « anti-PCSK9 ».....	189
9.4.	Hypocholestérolémie causée par une déficience en PCSK9.....	190
9.5.	Perspectives : Rôle potentiel de PCSK9 dans l'hépatite C et le diabète.....	192
9.5.1.	Hépatite C.....	192
9.5.2.	Diabète.....	193
	Conclusion.....	190

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques des lipoprotéines.....	4
Tableau 2. Description des différents agents pouvant induire l'expression du gène du récepteur LDL.....	17
Tableau 3. Caractéristiques de l'hypercholestérolémie familiale.....	40
Tableau 4. Défauts fonctionnels associés à une mutation naturelle « gain de fonction » ou « perte de fonction » de <i>PCSK9</i> chez l'humain.	60
Tableau 5. Caractéristiques cliniques des patients présentant une mutation « gain de fonction » de <i>PCSK9</i>	63
Tableau 6. Caractéristiques cliniques des patients portant une mutation des gènes <i>LDLR</i> et <i>PCSK9</i>	64
Tableau 7. Caractéristiques cliniques des mutations causant une hypocholestérolémie.....	68
Tableau 8. Description des différentes méthodes de détection de la <i>PCSK9</i> plasmatique.....	75

Liste des figures

Figure 1. Transport du cholestérol exogène et du cholestérol synthétisé de novo selon les voies exogène et endogène.....	8
Figure 2. Transport à rebours du cholestérol.....	10
Figure 3. Illustration des modules qui composent le récepteur LDL (LDLR).....	12
Figure 4. Principaux membres de la famille du LDLR chez l'humain.....	14
Figure 5. Régulation transcriptionnelle par la SREBP.....	16
Figure 6. Schématisation du gène <i>PCSK9</i> et de la protéine encodée.....	21
Figure 7. Schématisation de la structure primaire des neuf proprotéines convertases (PC).....	23
Figure 8. Analyse par <i>Northern blot</i> de l'ARNm de <i>PCSK9</i> dans différents tissus.....	25
Figure 9. Analyse par QPCR de l'expression de <i>PCSK9</i> normalisée par le niveau d'ARNm de la protéine ribosomale S16 dans des tissus de souris.....	26
Figure 10. Interface entre la <i>PCSK9</i> et le domaine EFG-A du LDLR.....	32
Figure 11. Schéma illustrant l'internalisation des lipoprotéines par le LDLR.....	42
Figure 12. Incidence des mutations de <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> , <i>PCSK9</i> et des autres gènes dans l'HF.....	46
Figure 13. Voie cellulaire et sites d'action de <i>PCSK9</i>	59
Figure 14. Niveaux de LDL-C plasmatique chez les Blancs de la cohorte DHS, les Noirs de la cohorte DHS et les Noirs de la cohorte Cook County.....	67

Figure 15. Un ELISA en sandwich.....	74
Figure 16. Effet de la ménopause et de l'usage d'œstrogènes chez la femme et effet de l'âge chez l'homme sur la concentration médiane de la PCSK9 plasmatique dans la cohorte « <i>Dallas Heart Study</i> ».....	78

Liste des abréviations

ABCA-1	<i>ATP-binding cassette A1</i>
ACAT	acylCoA-cholestérol-acyltransférase
ADH	hypercholestérolémie autosome dominant
Apo	apolipoprotéine
ARH	hypercholestérolémie autosome récessive
ASO	oligonucléotides anti-sens
CETP	protéine de transfert des esters de cholestérol
CL	cholestérol libre
CM	chylomicron
CRP	protéine C réactive
EC	ester de cholestérol
EGF-A	facteur de croissance épidermique-A
ELISA	dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
HCV	virus de l'hépatite C
HDL	lipoprotéine de haute densité
HF	hypercholestérolémie familiale
HL	lipase hépatique
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
HOMA-IR	modèle homéostatique d'évaluation de la résistance à l'insuline (<i>homeostasis model assessment of insulin resistance</i>)
HTZ	hétérozygote
IDL	lipoprotéine de densité intermédiaire
IMC	indice de masse corporelle
Insig	gène inductible par l'insuline
LCAT	lécithine :cholestérol acyl transférase
LDL	lipoprotéine de faible densité

LDLR	récepteur des LDL
LNP	nanoparticules lipidoïdes injectables
Lp(a)	lipoprotéine (a)
LPL	lipase lipoprotéique
LRP	récepteur apparenté au récepteur des LDL
LXR	récepteur hépatique X
MCV	maladie cardiovasculaire
MTP	protéine de transfert microsomiale
NARC-1	convertase neurale régulée par l'apoptose-1
NPC1L1	<i>Nieman-Pick C1-Like 1</i>
PC	proprotéine convertase
PCSK9	proprotéine convertase subtilisine/kexine-9
PL	phospholipides
PPAR α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
RAP	protéine associée au LDLR
SCAP	protéine de clivage de SREBP
SKI-1	isoenzyme subtilisine/kexine-like
SR-B1	récepteur scavenger de classe B, type 1
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
TG	triglycérides
VLDL	lipoprotéine de très faible densité

À Vincent-Olivier,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de recherche, Dr Jean Davignon et Nabil G. Seidah pour m'avoir permis de réaliser ce projet de doctorat. Je remercie tout spécialement Dr Davignon pour son support pendant les périodes difficiles que j'ai vécues tout au long de mes études. J'ai beaucoup apprécié son humanité et son écoute. Ce fut un honneur de côtoyer ce personnage exceptionnel. Dr Seidah est également un modèle à suivre en recherche par son enthousiasme, son efficacité et la vaste étendue de ses connaissances.

Je remercie également toute l'équipe du groupe de recherche sur les hyperlipidémies et l'athérosclérose de l'IRCM. Ce groupe comprenait d'excellents chercheurs et associés de recherche dont Lise Bernier, Jeffrey S. Cohn, Michel Tremblay, Lucie Boulet, Hélène Jacques et Claudia Rodriguez. Je les remercie grandement pour leur aide dans le projet PCSK9, car chacun y ayant contribué selon leur compétence respective : Michel était l'expert en biochimie et en ELISA, Lise Bernier et Lucie, les expertes en biologie moléculaire et génétique, puis Hélène et Claudia, expertes en biochimie des lipides. Je tiens également à remercier Lise St-Germain pour son incroyable capacité à régler tous les problèmes et à faire des diapositives rapidement. Je remercie aussi Carole Tremblay pour son aide administrative et son support moral. J'ai également beaucoup apprécié l'aide des infirmières de recherche, Lise Patenaude et Rina Casoni Riberdy, et des diététistes, Chantal Blais et Émilie Raymond, pour le recrutement des volontaires du volet clinique du projet PCSK9.

Je remercie grandement Hanny Wassef, collègue de doctorat, qui a partagé avec moi ces années de labeur, mais aussi tous les bons moments comme les congrès et les « partys ». Je lui souhaite aussi de terminer son doctorat bientôt! Je remercie également les étudiants que j'ai côtoyés au laboratoire : Evelyne Tarnus, Jean-François Carmel, Catherine Bouchard et Crina Solomon. Un merci spécial aussi à David Rhainds, collègue au

SCHOLAR d'Edmonton, qui a partagé avec nous ses connaissances infinies dans le domaine des lipides. Je tiens également à remercier nos amis médecins que j'ai eu la chance de côtoyer, les Drs Guillaume Paré, Alexis Baass et Fabienne Parente, pour leur aide et encouragements.

Enfin, j'aimerais offrir un remerciement particulier à mon conjoint, Jean-Marc, et à mes parents qui m'ont toujours appuyé et encouragée durant mes études.

Sur ce, bonne lecture!

Introduction

La maladie cardiovasculaire (MCV) est la principale cause de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés. Les complications découlant de la maladie cardiovasculaire sont la principale cause de décès à travers le monde. En 2004, au Canada, 32% des décès étaient causés par des maladies de l'appareil circulatoire, comparativement à 30% pour le cancer et 8,6% pour les maladies respiratoires ¹. Les principaux facteurs de risque traditionnels de la MCV sont la dyslipidémie, l'hypertension, le tabagisme, le sexe masculin, le diabète, l'âge, l'obésité et l'histoire familiale. Les habitudes de vie observées dans les pays industrialisés, impliquant un stress important, une mauvaise alimentation et le manque d'activité physique, sont également favorables au développement des MCV, mais leur impact spécifique demeure moins bien connu et varie souvent avec les populations étudiées.

La dyslipidémie, un des facteurs de risque les plus importants, peut résulter d'une hausse du cholestérol provenant des lipoprotéines de faible densité (LDL-C), mais aussi de la réduction du cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL-C). La dyslipidémie la plus commune et la plus importante d'un point de vue clinique est caractérisée par une augmentation des lipoprotéines riches en apolipoprotéine B (apoB) associées à une hypercholestérolémie, en présence ou absence d'hypertriglycéridémie, les triglycérides (TG) étant surtout transportés par les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) ². Une augmentation isolée du LDL-C représente un des risques les plus importants pour la MCV. Des études familiales ont également démontré l'importance de facteurs génétiques dans le développement de la maladie, particulièrement quand les complications apparaissent tôt. Des formes mendéliennes d'hypercholestérolémie ont été identifiées : premièrement, la forme autosomique dominante (*autosomal dominant hypercholesterolemia*; ADH) ³ et plus tard la forme autosomique récessive (ARH) ⁴.

De nombreuses approches sont utilisées pour tenter de diminuer le risque de maladie cardiovasculaire en prévention primaire et secondaire. Ces approches ne peuvent évidemment que jouer sur les facteurs de risque modifiables et visent habituellement la

modification des habitudes de vie (meilleure alimentation, arrêt de l'usage du tabac, diminution de la consommation d'alcool), la perte de poids, le contrôle de la pression artérielle, le contrôle du diabète et le traitement des dyslipidémies. Les traitements pharmacologiques sont souvent nécessaires, car une modification des habitudes de vie n'est souvent pas suffisante pour diminuer le risque de maladie cardiovasculaire. Les facteurs de risque non-modifiables, tels que le sexe, l'âge et la génétique, doivent être pris en compte dans la planification du traitement et justifieront habituellement une approche plus agressive. Les principales classes de médicaments utilisés dans le traitement des dyslipidémies sont les statines, les fibrates, la niacine et l'ézetimibe. Les statines sont des inhibiteurs de l'enzyme hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, l'enzyme clé de la biosynthèse du cholestérol. En diminuant la synthèse de cholestérol, les statines entraînent une surexpression du récepteur des LDL (LDLR) et une augmentation de la clairance des LDL. Cependant, malgré une bonne tolérance par la majorité des patients, la diminution du LDL-C demeure limitée et de plus en plus d'effets secondaires sont rapportés ⁵. L'utilisation de l'ézetimibe, un inhibiteur de l'absorption intestinale de cholestérol, en combinaison avec une statine réduit le LDL-C d'un 20% additionnel. D'autres approches complémentaires sont à l'étude, mais plusieurs d'entre elles se sont avérées toxiques chez l'humain. Il est clair que de nouvelles stratégies pour réduire davantage le niveau de LDL-C plasmatique sont nécessaires.

Ce projet de doctorat traite d'une nouvelle cible thérapeutique pour diminuer le LDL-C. En effet, le gène *PCSK9* a été identifié comme troisième locus impliqué dans l'hypercholestérolémie familiale ⁶ et son inhibition pourrait être utile pour diminuer davantage le LDL-C chez l'humain. La présente thèse exposera donc les grandes lignes de la découverte de la *PCSK9* ainsi que son rôle dans le métabolisme du cholestérol. Nos travaux qui font l'essentiel de cette thèse portent principalement sur la régulation *in vivo* et *in vitro* de la *PCSK9* chez l'humain. Ces études sont rapportées dans quatre articles publiés et font état entre autres de la découverte de la régulation du gène *PCSK9* par les statines *via* une réduction de la synthèse de cholestérol et de la présence d'un site conservé de liaison

au promoteur par le SREBP-2. La mesure de la PCSK9 circulante chez 254 volontaires sains et 1 739 enfants et adolescents, grâce au développement d'un test ELISA, a permis de d'établir plusieurs corrélations avec différents paramètres métaboliques dont le cholestérol total (CT), le LDL-cholestérol (LDL-C), les triglycérides (TG) et la glycémie à jeun. Chez les enfants et adolescents, la concentration de la PCSK9 plasmatique était également associée à l'âge, au sexe et à l'insulinémie à jeun, suggérant que PCSK9 pourrait jouer un rôle dans le développement à long terme de la dyslipidémie associée au syndrome métabolique. Finalement, chez les patients hypercholestérolémiques, la concentration plasmatique de la PCSK9 était significativement plus élevée que celle mesurée chez des sujets sains et nous avons démontré l'existence d'une relation linéaire positive entre le niveau de PCSK9 et la dose de statine, combinée ou non à l'ezetimibe.

1. Métabolisme des lipoprotéines

Les lipides circulent généralement dans le sang sous forme de lipoprotéines. Les lipoprotéines sont des agrégats de lipides et de protéines qui partagent une même structure de base. À maturité, elles sont le plus souvent de forme sphérique et constituées de deux parties : la surface et le noyau. Les lipides polaires hydrophiles (phospholipides et cholestérol non estérifié) et la fraction protéique (l'apolipoprotéine) se retrouvent à la surface, tandis que le noyau contient les lipides apolaires ou hydrophobes, soit les triglycérides (TG) et le cholestérol estérifié. Les lipoprotéines se distinguent entre elles par leur teneur et leur composition en apolipoprotéines et en lipides. Il existe six classes principales de lipoprotéines : les chylomicrons (CM), les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines de faible densité (LDL), les lipoprotéines de haute densité (HDL) et la lipoprotéine (a) (Lp(a)) ⁷. Les principales caractéristiques des lipoprotéines sont présentées au tableau 1.

Tableau 1. Caractéristiques des lipoprotéines. Tiré de Gagné et Gaudet, 2007 ⁷.

Lipoprotéine	Diamètre (Å)	Densité (g/ml)	Migration électrophorétique	Principaux lipides	Apo-lipoprotéines
Chylomicrons (CM)	900-5000	< 0,94	Origine	TG alimentaires	A-I, A-II B-48 CI, CII, CIII E
VLDL	500	<1,006	Pré-β	TG endogènes	B-100 CI, CII, CIII E
IDL	300	1,000-1,019	Pré-β	Cholestérol TG	B-100 C E
LDL	200	1,019-1,063	β	Cholestérol	B-100
HDL	50	1,063-1,210	α	Cholestérol	A-I, A-II C E
Lp(a)	250	1,055-1,120	Pré-β	Cholestérol	B-100 Apo(a)

Les apolipoprotéines sont importantes pour la structure des lipoprotéines et la solubilisation des lipides. Elles participent directement au métabolisme comme cofacteurs de réactions enzymatiques et elles interagissent avec des récepteurs cellulaires. Les apolipoprotéines C (apoC) se retrouvent surtout dans les lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons et VLDL) et ont des rôles de cofacteurs : l'apoCI est un activateur de la lécithine-cholestérol-acyltransférase (LCAT), l'apoCII est un cofacteur de la lipase lipoprotéique (LPL) et l'apoCIII est un inhibiteur de la LPL. On retrouve l'apoE dans les VLDL et les IDL, mais pas dans les LDL. L'apoE joue plusieurs rôles importants dans l'organisme dont la liaison aux récepteurs hépatiques, elle module la cholestérolémie et de la triglycéridémie, elle est impliquée dans des maladies neurodégénératives et possède des fonctions pléiotropes (signalisation, croissance, réparation cellulaire). L'apoA se retrouve quant à elle dans les HDL et possède également plusieurs rôles dont l'activation de la LCAT (apoAI), cofacteur de la lipase hépatique (apoA-II), antioxydant (apoA-IV) et modulation de la triglycéridémie (apoA-V). On distingue deux variétés principales d'apoB : l'apoB-48, d'origine intestinale, qui est associée au transport des lipides exogènes (chylomicrons et leurs résidus), et l'apoB-100, synthétisée par le foie, et qui intervient dans le transport des lipides endogènes (VLDL, IDL, LDL). Il n'y a qu'une molécule d'apoB-48 par chylomicron et une seule d'apoB-100 par particule de VLDL, IDL et LDL. Ces caractéristiques impliquent que la mesure de l'apoB est un bon indicateur du nombre de particules en circulation et peut être utile dans le suivi clinique des patients ⁷.

Le transport des différents lipides en circulation se fait en suivant trois voies: le transport des lipides exogènes de l'intestin vers les autres tissus, le transport des lipides endogènes du foie vers les autres tissus et le transport à rebours du cholestérol, des tissus périphériques vers le foie et les tissus stéroïdogéniques pour son élimination.

1.1. Voie exogène

La fonction de la voie des lipides exogènes est d'amener les lipides alimentaires (de provenance exogène) aux tissus pour la production d'énergie, le stockage ou la synthèse de molécules (Figure 1). Les lipides alimentaires sont hydrolysés dans l'intestin grêle et sont absorbés par les cellules épithéliales intestinales. Dans la cellule épithéliale intestinale, les lipides sont réestérifiés et assemblés à l'aide de l'apoB-48 pour former les CM. Les CM sont sécrétés dans la lymphe d'où elles sont dérivées vers la circulation sanguine. Au niveau des capillaires, des muscles et du tissu adipeux, les TG contenus dans les CM sont hydrolysés en acides gras libres par la lipase lipoprotéique (LPL) pour stockage ou production d'énergie. Le ratio entre l'apoCII et l'apoCIII présentes dans les CM déterminera la rapidité à laquelle le CM sera transformé en résidu de CM, puisque l'apoCII est un cofacteur pour la LPL et l'apoCIII, un inhibiteur de la LPL. Comme seuls les TG ont été hydrolysés, le résidu sera enrichi en esters de cholestérol et en apoE, alors que l'apoAI, A-II, C-II et C-III seront échangées vers d'autres lipoprotéines en circulation. L'apoAI relâchée pourra également servir de précurseur de HDL. Les résidus de CM sont captés par le foie *via* le LDLR, la protéine apparentée au LDLR (LRP, « *low density lipoprotein receptor-related protein* ») et le récepteur scavenger de classe B, type 1 (SR-B1). Les chylomicrons sont présents dans la circulation environ une heure après un repas et disparaissent normalement 8 à 10 heures après l'ingestion alimentaire⁷.

1.2. Voie endogène

Quelques heures suivant un repas, lorsque la quantité de CM en circulation est faible, les besoins en TG des tissus périphériques sont assurés par les lipides synthétisés par le foie ou transitant par celui-ci (les acides gras libres provenant de la lipolyse), qui sont alors acheminés par les VLDL (Figure 1). De la même manière que les CM, les VLDL sont

hydrolysées par la LPL à la surface des cellules endothéliales et l'activité LPL est modulée par le ratio apoCII/apoCIII. Les acides gras libérés par ces lipases serviront alors de source d'énergie aux différents tissus. Les résidus des VLDL, les IDL, subissent l'hydrolyse de leurs TG par l'action de la lipase hépatique (HL), menant ainsi à la particule LDL fortement enrichie en esters de cholestérol. La HL peut aussi hydrolyser les TG restant dans la particule LDL. Ainsi, en cours de route, les particules de VLDL sont transformées en LDL, soit par échange ou soit par libération d'apolipoprotéines dans le plasma. À la fin du processus, il ne reste, en général, qu'une seule molécule d'apoB-100, nécessaire au maintien de l'intégrité des LDL. Une partie des VLDL et des IDL est internalisée par des récepteurs membranaires, principalement par le VLDL-R, surtout présents dans les muscles et le tissu adipeux. Les LDL sont retirées de la circulation par le LDLR. Le LDLR est présent sur la surface cellulaire de tous les tissus, mais surtout dans le foie. Les LDL se lient à ces récepteurs par l'intermédiaire de l'apoB. L'endocytose permet au complexe récepteur-LDL de pénétrer dans la cellule, où le complexe est dissocié permettant ainsi le recyclage du récepteur et l'hydrolyse des LDL dans les lysosomes. Par la suite, l'acyl-CoA-cholestérol-acyltransférase (ACAT) est activée pour réestérifier le cholestérol. Le LDLR permet donc à la cellule l'entrée de cholestérol pour la synthèse de membranes et autres fonctions cellulaires, et permet aussi de régulariser les concentrations de LDL circulantes.

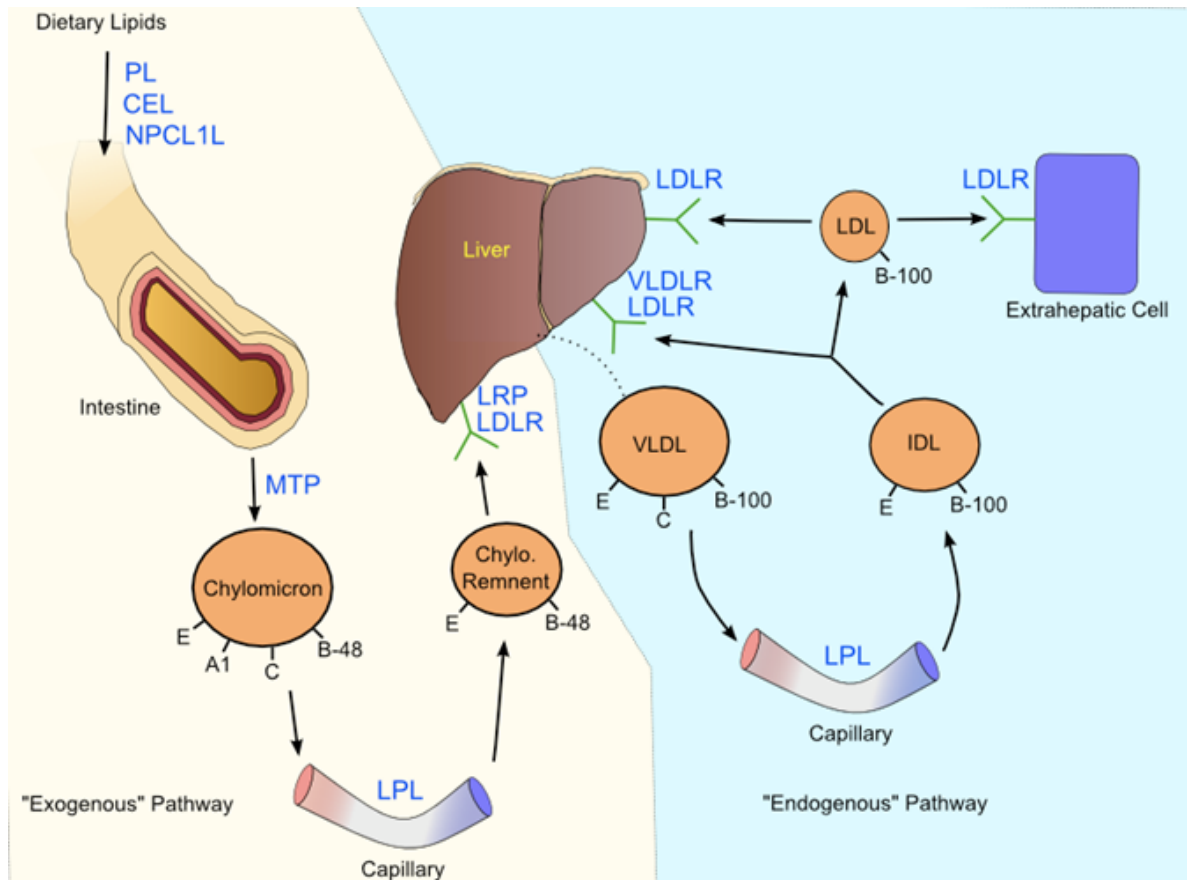


Figure 1. Transport du cholestérol exogène et du cholestérol synthétisé *de novo* selon les voies exogène et endogène. « *Exogenous* » pathway, voie exogène; « *endogenous* » pathway, voie endogène; *capillary*, capillaire; *remnant*, résidu; *dietary lipids*, lipides alimentaires. Tiré de Daniels & Killinger, Int J Biol Sci, 2009⁸ et disponible à <http://www.biolsci.org/v05p0474.htm>.

1.3. Transport à rebours du cholestérol

Cette voie de transport du cholestérol joue un rôle important dans la protection contre l'athérosclérose. Selon plusieurs modèles, les HDL captent le cholestérol libre des cellules périphériques pour le transporter au foie pour son élimination (Figure 2). Les apolipoprotéines composant la partie protéique des HDL sont synthétisées par le foie et

l'intestin et proviennent également de l'hydrolyse des CM et des VLDL par les lipases, qui relâchent alors des constituants (apolipoprotéines, cholestérol libre, TG, phospholipides) en circulation.

Les phospholipides (PL) composant les HDL proviennent principalement des autres lipoprotéines, lors de leur hydrolyse. Les HDL reçoivent du cholestérol libre (CL) et des esters de cholestérol (EC) des autres lipoprotéines lors de leur hydrolyse, mais aussi *via* le SR-B1 et le transporteur *ATP-binding cassette A1* (ABCA-1). Le CL est alors estérifié par la LCAT. Au fur et à mesure que la HDL reçoit du cholestérol, sa taille augmente, passant de la classe HDL₃ à la classe HDL₂. Les EC peuvent par la suite être échangés contre des TG entre les HDL et les lipoprotéines contenant l'apoB-100 par l'action de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP). Les EC ainsi transférés aux LDL et aux VLDL retourneront alors au foie *via* le LDLR. La HDL sera captée par un récepteur SR-B1 du foie ou d'un tissu stéroïdogénique auquel elle donnera son cholestérol. Il est important de noter que la HDL n'est pas internalisée par le SR-B1; après avoir livré ses EC, la HDL se retrouve à nouveau en circulation et redevient disponible pour recevoir des EC. La HL est capable d'hydrolyser les TG contenus dans la HDL. Dans le foie, le cholestérol sera transformé en sels biliaires ou sera directement excrété dans la bile, alors que dans les tissus stéroïdogéniques, le cholestérol sera transformé en hormones stéroïdiennes. L'apoAI dissociée est éliminée par les reins, et peut soit servir de précurseur de HDL ou soit s'associer à une HDL mature.

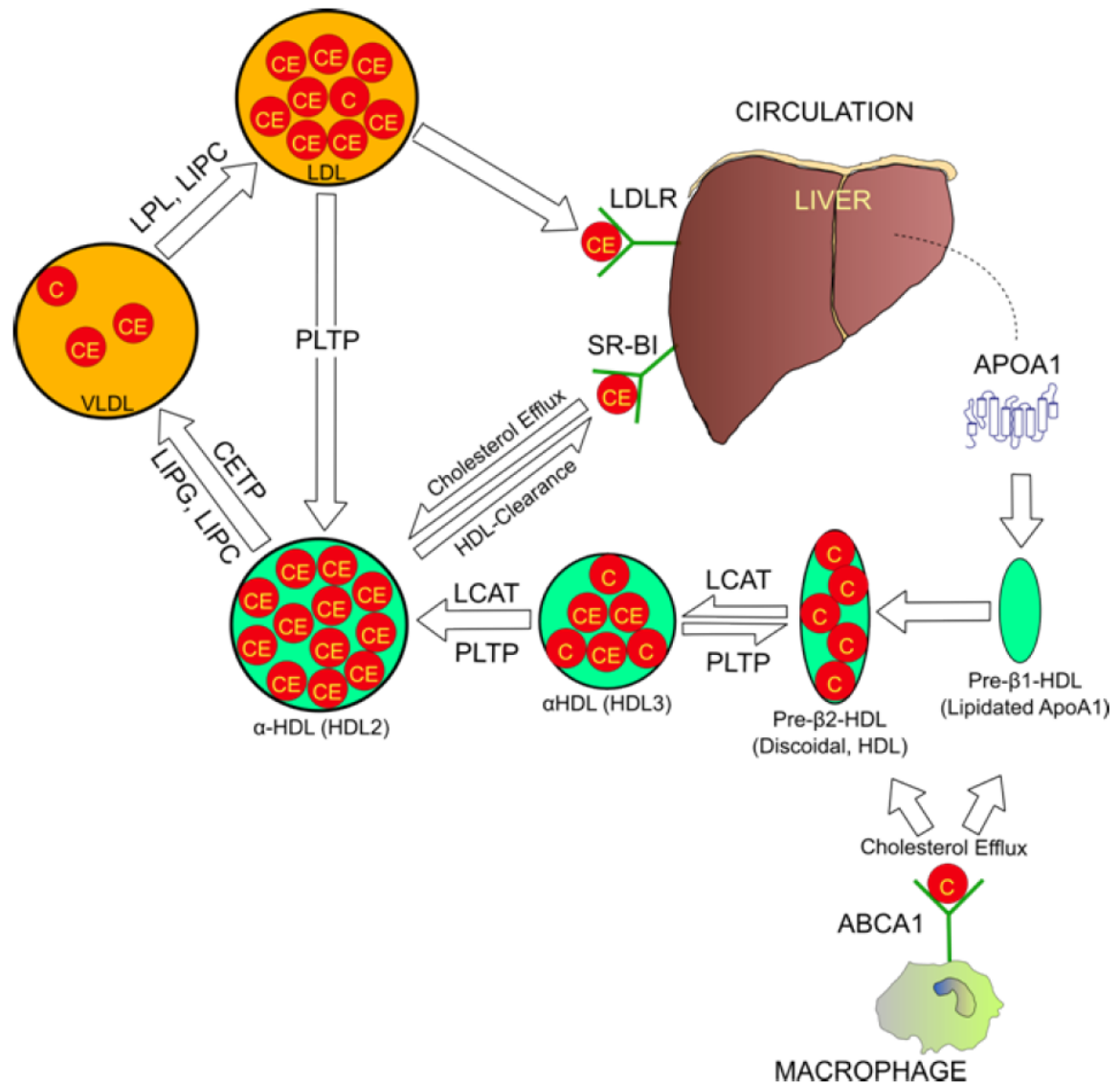


Figure 2. Transport à rebours du cholestérol. Les flèches représentent les mouvements du cholestérol et la maturation des particules. Le « C » représente le cholestérol libre et le « CE » le cholestérol estérifié. *Liver*, foie; *cholesterol efflux*, efflux de cholestérol; *HDL-clearance*, clairance des HDL; *discoïdal*, discoïde; *lipidated*, lipidé. Tiré de Daniels & Killinger, Int J Biol Sci 2009⁸ et disponible à <http://www.biolsci.org/v05p0474.htm>.

2. Rôle primordial du LDLR

2.1. Famille LDLR

Le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDLR) est une glycoprotéine de surface cellulaire qui joue un rôle critique dans le contrôle du cholestérol plasmatique en effectuant la clairance des lipoprotéines riches en cholestérol de la circulation ⁹. En effet, l'hypercholestérolémie familiale (HF), qui est l'une des erreurs de métabolisme héréditaires les plus communes, est causée par des mutations « perte de fonction » du gène encodant le LDLR ¹⁰.

2.1.1. Identification du LDLR

Brown & Goldstein ont été les premiers à identifier le LDLR en 1973 lors de leur recherche des bases moléculaires de l'HF ^{9,11-13}. Ils ont observé que les fibroblastes normaux en culture supprimaient la synthèse endogène de cholestérol lorsque ce dernier leur était fourni *via* les LDL dans le milieu de culture, tandis que les fibroblastes de patients HF ne supprimaient la synthèse de cholestérol que si le cholestérol était fourni sous forme soluble, et non sous forme de LDL ^{14,15}. Peu après, ils ont démontré que les fibroblastes normaux avaient des sites de liaison d'une grande affinité pour les particules de LDL, tandis que les fibroblastes de patients HF ne présentaient pas ces sites de liaison ^{16,17}. Une décennie plus tard, le gène du LDLR était cloné et séquencé ¹⁸⁻²¹.

2.1.2. Ligands physiologiques

À pH neutre, les lipoprotéines circulantes se lient au LDLR. Le plus important ligand physiologique est la LDL, qui contient une seule copie de l'apoB-100 et transporte environ 65% à 70% du cholestérol plasmatique chez l'humain. Également, le LDLR lie très

fortement les lipoprotéines contenant plusieurs copies de l'apoE, comme les formes de VLDL à migration β (β -VLDL), ou leurs intermédiaires, et les HDL^{22,23}.

2.1.3. Structure du LDLR

Le LDLR humain mature est une protéine transmembranaire modulaire de type I et est constitué de 839 acides aminés. Le récepteur contient trois types de modules protéiques extracellulaires, commençant par sept répétitions contigües riches en cystéines, d'environ 40 résidus chacune¹⁸⁻²¹. Ces modules se nomment répétitions de type A du LDLR (LA) ou répétitions R1 à R7, et représentent le site de liaison au ligand (Figure 3). Ensuite, une région de 400 acides aminés, comportant une similarité de séquence de 35% avec le précurseur du facteur de croissance épidermique (EGF), suit immédiatement les sept modules LA. Cette partie du récepteur consiste en deux répétitions EGF-like, suivies du domaine YWTD (nommé ainsi pour les résidus tyrosine, tryptophane, thréonine et aspartate), puis une troisième répétition EGF-like. Le tout est ensuite suivi d'une région de 58 acides aminés riche en sérines et thréonines qui subissent une O-glycosylation, suivie d'un segment transmembranaire et d'une queue cytoplasmique de 50 acides aminés. Cette dernière contient une séquence NPxY qui dirige le récepteur vers les puits de clathrine²⁴, et aussi une séquence requise pour diriger le récepteur vers la membrane basolatérale dans les cellules polarisées. Lors de sa synthèse et de son repliement dans le réticulum endoplasmique (RE), le récepteur est associé à une protéine chaperon nommée « *receptor-associated protein* » (RAP) qui se lie aux répétitions LA pour assurer un bon repliement et empêcher la liaison d'un ligand pendant le transport du récepteur²⁵.

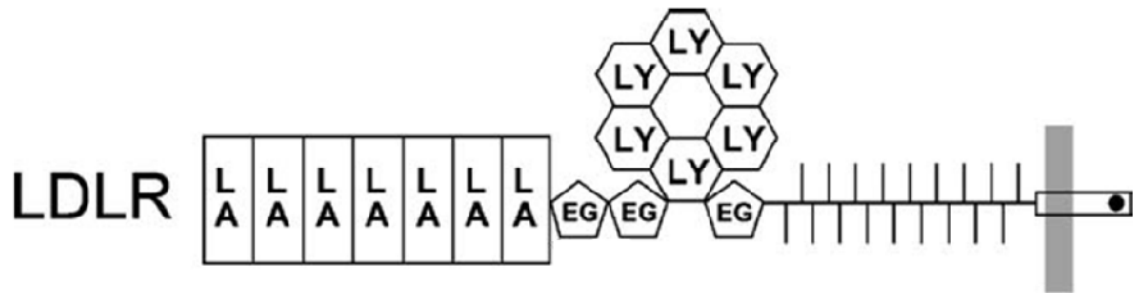


Figure 3. Illustration des modules qui composent le récepteur LDL (LDLR). Abréviations : LA, répétitions de type A (liaison au ligand ou R1-R7) du LDLR; EG, modules EGF-like; LY, répétitions contenant le motif YWTD (*β -propeller*). La région de liaison au ligand se situe à travers les répétitions LA, et la région homologue à l'EGFP, responsable du relâchement du LDL à pH acide, comprend les régions EGF et YWTD. Tiré de Jeon & Blacklow, 2005 ¹⁰.

2.1.4. Famille du LDLR

Le LDLR est le principal membre d'une classe entière de récepteurs qui contiennent le même type de domaines, soit les modules LA, EGF-like et YWTD *β -propeller*, arrangés selon un patron similaire (Figure 4). Le LDLR est donc le prototype de cette famille qui comprend également le VLDLR, le récepteur ApoER2, la LRP et la mégaline. Ces récepteurs lient des ligands vraiment très différents et on spécule que le domaine de liaison au récepteur soit constitué d'un potentiel électrostatique positif plutôt que d'une séquence primaire d'acides aminés conservés. Cette famille de récepteurs joue plusieurs rôles physiologiques importants. Le LDLR joue un rôle dans l'homéostasie du cholestérol. La LRP joue un rôle dans la clairance de l' α_2 -macroglobuline activée et des lipoprotéines riches en apoE. La LRP est essentielle pour le développement fœtal et a été associée à la maladie d'Alzheimer. La mégaline est un récepteur majeur dans les cellules épithéliales des tubules proximaux des reins et est un déterminant antigénique pour la néphrite de Heymann chez le rat. Des mutations dans l'homologue du VLDLR du poulet causent une stérilité chez la femelle et une athérosclérose précoce. Ce récepteur n'est pas exprimé dans le foie,

mais son expression transgénique y corrige l'hypercholestérolémie chez les animaux expérimentaux, suggérant que le VLDLR pourrait être un candidat pour la thérapie génique dans plusieurs types d'hyperlipidémies. L'importance fonctionnelle de chaque récepteur pourrait résider dans leur différente expression tissulaire²⁶.

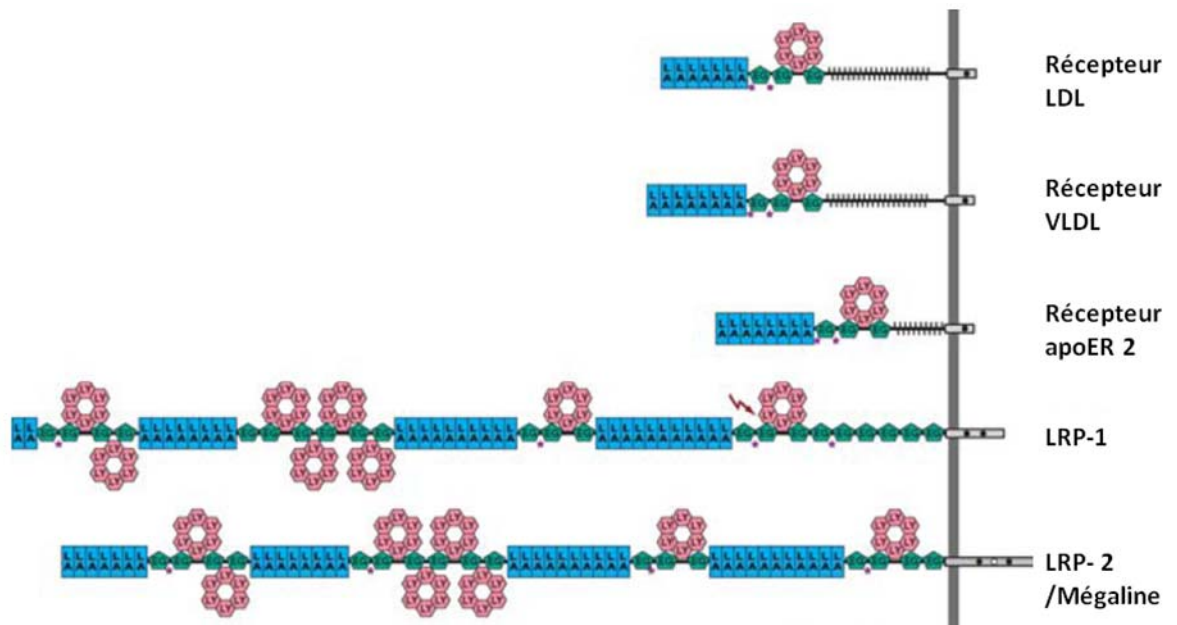


Figure 4. Principaux membres de la famille du LDLR chez l'humain. Abréviations : LA, répétitions de type A du LDLR; EG, modules EGF-like; LY, répétitions contenant le motif YWTD. Les cercles noirs et blancs représentent les motifs NPXY et NPXY-like, respectivement. Adapté de Springer TA, 1998²⁷.

2.2. Régulation du LDLR

La régulation transcriptionnelle du LDLR dépend principalement de la voie du SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*) (Figure 5). Les SREBP sont des facteurs de transcription qui sont synthétisés sous forme de précurseurs associés à la

membrane du RE. Il existe trois formes de SREBP : SREBP-1a, SREBP-1c, et SREBP-2. En général, SREBP-1a et SREBP-2 activent les mêmes familles de gènes, mais avec une efficacité différente. Dans le foie et les cellules en culture, SREBP-1a favorise la voie de synthèse des acides gras, tandis que SREBP-2 est plus spécifique à la voie de synthèse du cholestérol³. Comme ses homologues SREBP-1a et SREBP-1c, SREBP-2 forme un complexe contenant un senseur du cholestérol nommé « SREBP *cleavage-protein* » (SCAP) et une protéine de rétention dans le RE, le « *insulin-inducible gene* » (Insig). En présence de stérols, surtout de cholestérol, ce complexe est retenu dans le RE et le SREBP-2 demeure inactif. Par contre, quand les concentrations de cholestérol sont basses dans la membrane du RE, la protéine SCAP change de conformation et se dissocie de l'Insig. Le complexe SCAP-SREBP-2 est alors transporté vers le Golgi, où SREBP-2 subit un clivage protéolytique par S1P (*site 1 protease*, aussi connue sous le nom de SKI-1), une proprotéine convertase de la même famille que PCSK9, suivi d'un autre clivage par la métalloprotéase membranaire S2P (*site-2 protease*). SREBP-2, devenu actif, est ensuite libéré dans le cytosol et migre vers le noyau où il active la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol²⁸. Tout comme plusieurs autres gènes répondant aux stérols, la région promotrice du *LDLR* contient un « *sterol regulatory element (SRE)* », la principale séquence de liaison du SREBP-2^{29,30}. Le *LDLR* est donc très sensible aux changements de niveaux de stérols intracellulaires.

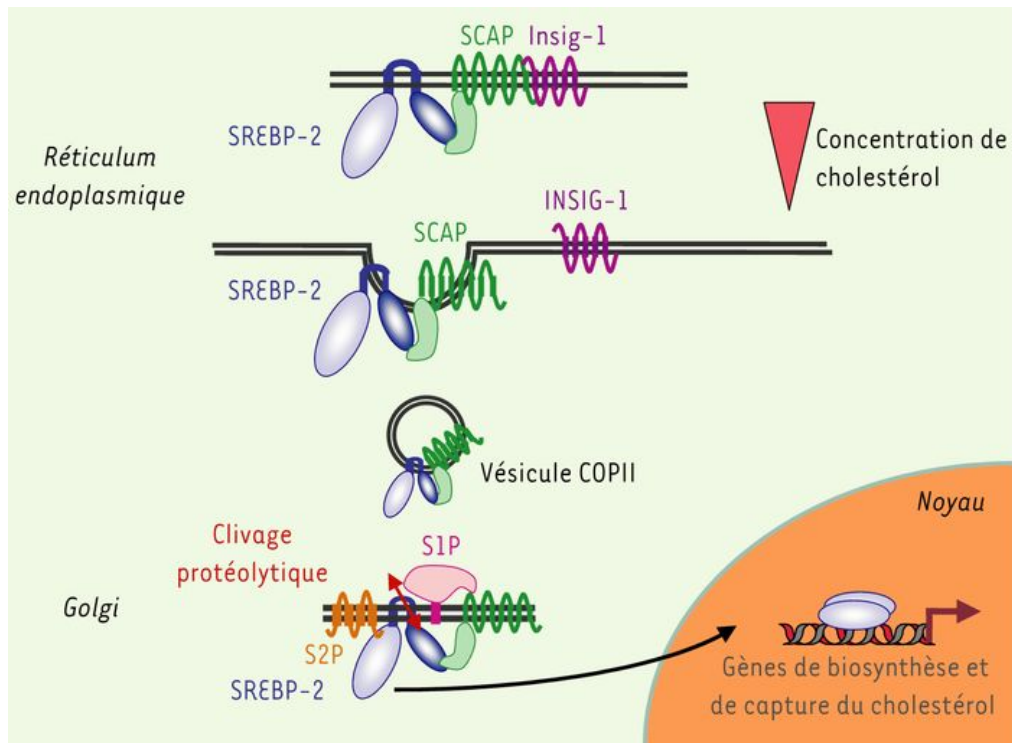


Figure 5. Régulation transcriptionnelle par la SREBP. À l'état basal, la forme précurseur SREBP-2 est ancrée dans les membranes du réticulum endoplasmique et forme un complexe avec les protéines SCAP. Le complexe SREBP-2/SCAP est retenu dans le réticulum par les protéines de rétention Insig-1. Lorsque la concentration de cholestérol diminue, la SCAP qui est un « senseur » de cholestérol change de conformation, se libère des protéines Insig et entraîne le précurseur SREBP-2 vers le Golgi par l'intermédiaire de vésicules de type COPII, où il subit un double clivage protéolytique par les protéases S1P et S2P, libérant la partie amino-terminale qui migre dans le noyau et active les promoteurs des gènes de biosynthèse et de capture du cholestérol. Tiré de Foufelle & Hegarty, M/S : médecine sciences, 2005 ³¹.

En plus du cholestérol et de ses dérivés, plusieurs médiateurs non-stéroïdiens comme certaines hormones, cytokines, facteurs de croissance et seconds messagers régulent la transcription du gène *LDLR*. Certains d'entre eux sont d'origine physiologique, tandis que d'autres sont d'origine pharmacologique. Leurs effets sur l'expression du LDLR sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2. Description de différents agents pouvant induire l'expression du gène du récepteur LDL. Traduit de Kong *et al.* J Mol Med 2006 ³².

Agent	Site d'action	Dépendance des stéroïdes	Voie de signalisation
Statines	Transcription	Dépendant	-
Estrogènes	Transcription	Indépendant	-
Insuline/Facteurs de croissance	Transcription	Indépendant	ERK
TNF- α /IL-1	Transcription	Dépendant	ERK
OM	Transcription	Indépendant	ERK
PMA	Transcription/ Post-transcription	Indépendant	PKC
Berberine	Post-transcription	Indépendant	ERK

ERK, *extracellular signal-regulated kinase*; TNF, facteur de nécrose tumorale; IL, interleukine; OM, oncostatine; PMA, phorbol-12-myristate-13-acétate; PKC, protéine kinase C.

2.3. Mécanisme de capture, d'endocytose et de recyclage

Tel que décrit précédemment, les principaux ligands du récepteur des LDL sont l'apoB-100 et l'apoE. Les lipoprotéines qui contiennent plusieurs copies de l'apoE se lient au LDLR avec une affinité 20 fois plus grande que celle pour les LDL qui contiennent l'apoB. Environ 45 minutes après leur synthèse, les LDLR apparaissent sur la surface cellulaire externe, où ils se rassemblent dans les puits recouverts de clathrine sur la surface interne de la membrane plasmique. Trois à cinq minutes suivant la formation de ces puits, il se crée une invagination résultant en une vésicule endocytaire enrobée. Très rapidement, la clathrine se dissocie de la vésicule et plusieurs vésicules fusionnent pour former de plus grands saccules au contour irrégulier appelées endosomes ³³. Grâce à l'action de pompes à protons situées sur la membrane des endosomes, le pH baisse sous 6,5, permettant la

dissociation de la LDL du récepteur. Ce dernier retourne à la surface en se rassemblant avec d'autres récepteurs dans une région de la membrane de l'endosome qui se détache par pincement pour former une vésicule de recyclage^{34,35}. Une fois sur la surface, le récepteur des LDL lie une autre lipoprotéine et initie un autre cycle d'endocytose. Chaque récepteur des LDL effectue un cycle toutes les 10 minutes de manière continue, qu'il soit lié ou non à une particule LDL³⁵. La LDL qui se dissocie du récepteur est acheminée au lysosome lorsque la membrane de l'endosome fusionne avec celle du lysosome. À l'intérieur du lysosome, des hydrolases acides dégradent la LDL : l'apolipoprotéine est dégradée en acides aminés, tandis que les esters de cholestérol sont hydrolysés par la lipase acide lysosomiale³⁶. Le cholestérol libre ainsi produit traverse la membrane du lysosome et entre dans le cytosol où il peut être utilisé pour la synthèse de membranes cellulaires et comme régulateur de l'homéostasie du cholestérol intracellulaire^{3,37}.

3. PCSK9

3.1. Découverte

Les protéases (ou peptidases ou enzymes protéolytiques) sont des enzymes qui brisent les liaisons peptidiques des protéines. On parle alors de coupure protéolytique ou protéolyse. Une grande partie des protéines et des peptides qui sont biologiquement actifs sont générés à partir de précurseurs inactifs par protéolyse. Les molécules suivantes font partie de ces substances qui nécessitent une activation par clivage : hormones peptidiques et neuronales, enzymes protéolytiques, facteurs de croissance, et plusieurs protéines transmembranaires (type I), dont plusieurs récepteurs, molécules d'adhésion cellulaire, glycoprotéines de surface cellulaire d'espèces pathogéniques virales et bactériennes, de même que des molécules de signalisation cellulaire et des facteurs de transcription ³⁸. L'activation par clivage peut se faire autant à l'intérieur de la cellule, sur la surface cellulaire que dans le milieu extracellulaire.

Les protéases sont regroupées en familles mécanistiques, en fonction de la nature du ou des acides aminés du site actif impliqué dans la catalyse. On distingue ainsi : (1) les protéases à sérine, qui possèdent une triade catalytique caractéristique comprenant une sérine, une histidine et un aspartate; (2) les protéases à thiol, qui possèdent une cystéine dans leur site actif; (3) les protéases acides, qui agissent à pH acide et possèdent un acide aspartique dans leur site actif; (4) les métalloprotéases, qui possèdent un cation métallique (généralement le zinc) fixé fortement à la protéine; (5) les protéases à thréonine; et (6) les protéases à acide glutamique. Neuf protéases à sérine responsables de clivage intracellulaire, appelées proprotéines convertases (PC) et apparentées à la famille des subtilases bactériennes, ont été identifiées et caractérisées jusqu'à maintenant. Sept d'entre elles appartiennent à la sous-famille de la kexine de levure et présentent une spécificité de clivage pour des sites basiques selon le consensus (K,R)-(X)_n-(K,R)↓, où n=0, 2, 4, ou 6 et ↓=coupure. Ce sont les PC1/3, PC2, furine, PC4, PACE4, PC5/6 et PC7 ³⁸. La huitième convertase, la « *subtilisin-kexin-like isoenzyme* » appelée SKI-1/S1P, appartient à la sous-

famille pyrolysine des subtilases et clive des résidus non-basiques selon le motif (R,K)-X-(hydrophobique)-(L,T,K,F)↓³⁹.

La découverte de PCSK9 s'est faite suite à la recherche de nouvelles convertases en utilisant de courtes séquences conservées de la sous-unité catalytique de SKI-1 dans le moteur de recherche de protéines BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)⁴⁰. Le groupe de Nabil G. Seidah a identifié dans la banque de données brevetées une convertase potentielle nommée « *neural apoptosis-regulated convertase 1* » (NARC-1; Millenium Pharmaceuticals, Cambridge, MA, patent no. WO 01/57081 A2). NARC-1 avait initialement été identifiée *via* le clonage d'ADNc exprimés suite à l'induction de l'apoptose due à l'absence de sérum sur des cultures primaires de neurones du cervelet. Ce 9^e membre de la famille des subtilases, dorénavant appelé PCSK9⁶, est synthétisé sous forme de zymogène (proPCSK9; précurseur inactif de cette enzyme). La PCSK9 doit être activée par un autoclivage intramoléculaire dans le RE au site SSVFAQ↓SIPWNL₁₅₈, créant ainsi un pro-segment d'environ 14 kDa qui demeure associé à la protéine lors de sa sécrétion^{40,41}.

Parallèlement, Abifadel *et al.*⁶ faisaient le lien entre une mutation de *PCSK9* et l'hypercholestérolémie familiale. En effet, suite à une analyse par clonage positionnel de l'ADN de familles atteintes d'HF où l'implication du *LDLR* et de l'*APOB* avait été exclue, *PCSK9* a été identifié comme 3^e locus associé à l'ADH (appelé *HCHOLA3* ou *FH3*). En fait, la région avait déjà été localisée à 1p34.1-p32 (OMIM 603776)⁴² et confirmée dans une grande famille de l'Utah⁴³. La région ciblée contenait 41 gènes, incluant *PCSK9*. Suite au séquençage des 12 exons de *PCSK9*, les auteurs ont identifié dans la famille HC92 une substitution T→A dans l'exon 2 prédisant une substitution au codon 127 d'une arginine à la place d'une sérine (S127R), créant ainsi un site de clivage *MnII*⁶. Les autres membres de la famille ainsi que 100 sujets témoins ont été testés pour cette substitution. Elle était absente dans 200 chromosomes contrôles démontrant que ce n'est pas un polymorphisme. La mutation a été retrouvée chez les 12 membres affectés de cette famille avec une pénétrance

estimée à 0,94. Cette mutation a également été retrouvée dans la famille HC2 et ségrégait avec la maladie.

De plus, *via* le séquençage des 12 exons de *PCSK9* chez 22 patients ADH, une 2^e mutation a été identifiée ⁶ chez le propositus de la famille HC60 qui est décédé à l'âge de 49 ans d'un infarctus du myocarde. Il s'agissait d'une substitution du nucléotide thymine par la cytosine à la position 890 de l'ADN complémentaire (c.890T>C), résultant en une substitution d'acide aminé F216L. Cette mutation ségrégait avec le phénotype ADH dans la famille et était absente dans 200 chromosomes contrôles.

3.2. Structure : gène et protéine

Le gène *PCSK9* humain est situé sur le chromosome 1 à 1p32.3. L'ADNc de *PCSK9* (NM_174936) s'étend sur 3 636 pb et comprend 12 exons codant pour une protéine de 692 acides aminés (Figure 6).

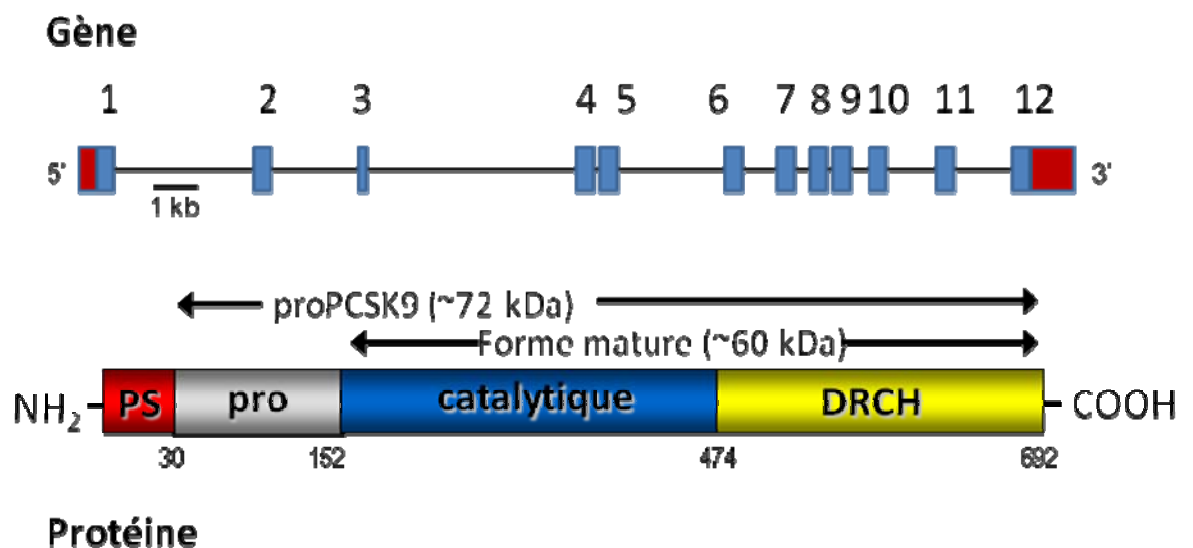


Figure 6. Schématisation du gène *PCSK9* et de la protéine encodée. PS, peptide signal; pro, prosegment; catalytique, domaine catalytique; DRCH, domaine riche en cystéines et histidines.

Suite à une analyse d'identité de séquence, PCSK9 a été classifiée comme la 9^e proprotéine convertase de la famille des subtilases, présentant 42% d'identité avec la protéinase K⁴⁰. Comme les autres membres de la famille, le peptide signal (acides aminés 1-30) est suivi du pro-domaine (acides aminés 31-152), du domaine catalytique (acides aminés 153-474) et d'un domaine riche en cystéines et en histidines (CHRD), tel qu'illustré à la figure 7. Les acides aminés Asp186, His226 et Ser386 forment la triade catalytique tandis que l'Asn317 occupe la poche oxyanionique⁴⁰. Cependant, PCSK9 est dépourvue de domaine P qui est requis pour le repliement et la régulation de l'activité catalytique chez les autres PC⁴⁴. Finalement, PCSK9 possède une N-glycosylation à Asn533 dans le domaine CHRD, une tyrosine sulfatée dans le pro-segment (Tyr38)⁴¹ ainsi que deux résidus phosphorylés, un dans le pro-segment (Ser47) et un autre dans le domaine C-terminal (Ser688)⁴⁵. Généralement, la sulfatation des résidus tyrosines favorise les interactions protéine-protéine⁴⁶, mais le rôle de cette modification post-traductionnelle chez PCSK9 n'a pas été défini. Il a toutefois été montré que l'absence de sulfatation dans le pro-domaine (Tyr38) et/ou l'absence de glycosylation dans le domaine C-terminal (N533) n'altère(nt) pas de façon significative l'activation de PCSK9, sa sécrétion ou son action sur le LDLR⁴⁶.

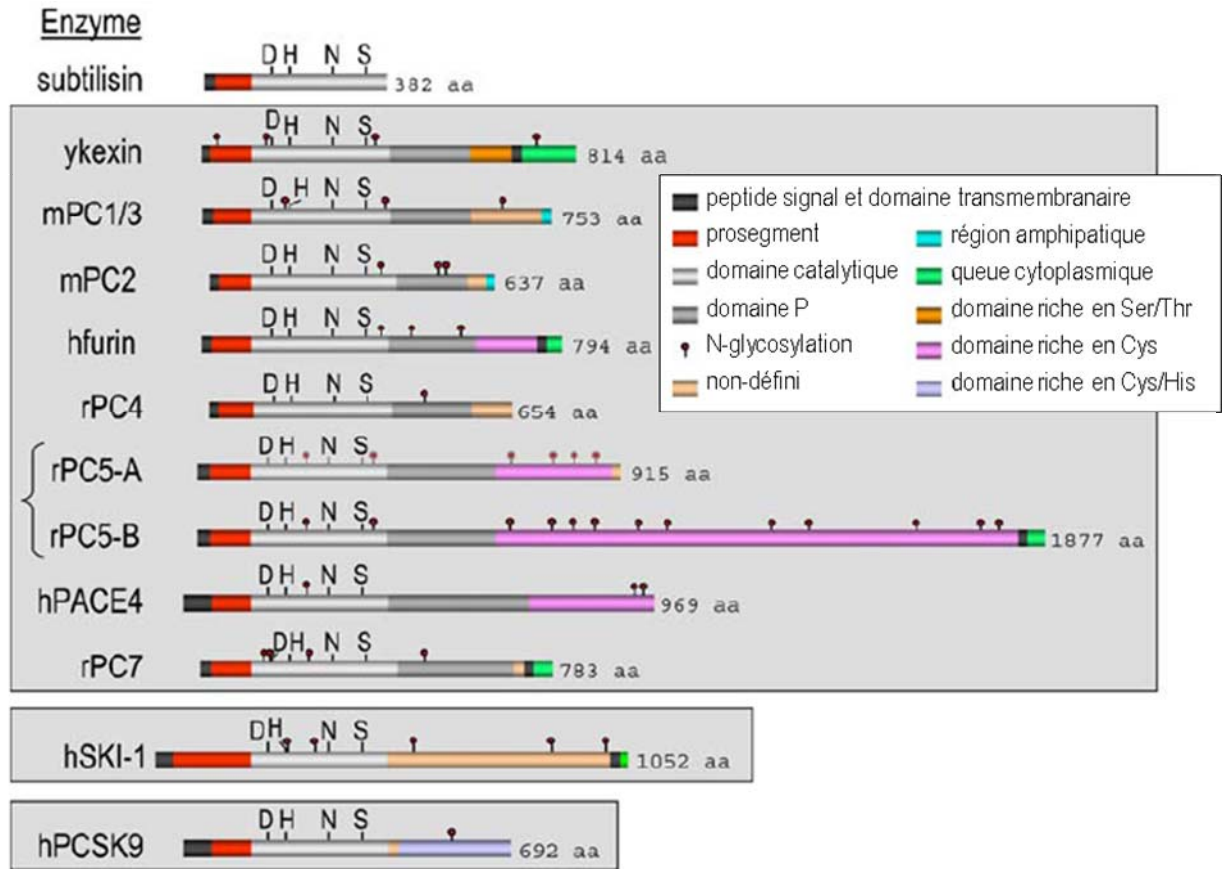


Figure 7. Schématisation de la structure primaire des neuf proprotéines convertases (PC). Les PC spécifiques aux acides aminés basiques et la «*ykexin*», SKI-1, et PCSK9 sont encadrées individuellement pour mettre l’emphase sur leurs sous-classes distinctes. PC5 existe sous deux isoformes, la PC5A soluble et la PC5B liée à la membrane. Les résidus de la triade catalytique Asp, His et Ser et la poche oxyanionique Asn sont indiqués. H, humain; r, rat; m, souris (*mouse*); et y, levure (*yeast*). Traduit de Seidah & Prat, J Mol Med 2007⁴⁷.

La PCSK9 est donc synthétisée sous forme de précurseur d’environ 72 kDa qui doit subir un clivage autocatalytique entre le pro-domaine et le domaine catalytique à l’intérieur du RE pour pouvoir être sécrétée (Figure 6)^{40,44}. Comme décrit précédemment, le clivage se fait au site SSVFAQ↓SIPWNL₁₅₈, créant ainsi un pro-domaine d’environ 14 kDa qui demeure associé à la protéine lors de sa sécrétion^{40,41}. Cependant, PCSK9 diffère des autres PC parce qu’elle ne clive pas après un résidu basique⁴⁸. De plus, contrairement aux autres

PC, le clivage autocatalytique de PCSK9 ne requiert pas de calcium ⁴¹. Malgré tous les efforts consentis, aucun autre substrat qu'elle-même n'a été identifié à ce jour.

3.3. Expression tissulaire

Une analyse de l'expression de PCSK9 par hybridation *in situ* durant l'ontogénèse chez la souris a montré que PCSK9 était exprimé de façon transitoire pendant la formation du télencéphale, du cervelet et du cortex rénal ⁴⁰. De plus, l'expression de PCSK9 était élevée pendant le développement du foie et des villosités intestinales, puis de plus faible intensité à l'âge adulte, mais tout de même significative.

Une analyse de la distribution tissulaire chez le rat adulte par *Northern blot* (buvardage par *Northern*) (Figure 8B) a montré que l'ARNm de PCSK9 était exprimé dans un nombre limité de tissus incluant le foie, le rein, le cervelet, et l'intestin grêle ⁴⁰. Chez les lignées cellulaires humaines, PCSK9 est principalement exprimé dans les cellules de neuroépithéliome SK-NMCIXC, de carcinome du colon LoVo-C5 et d'hépatome HepG2 (Figure 8A).

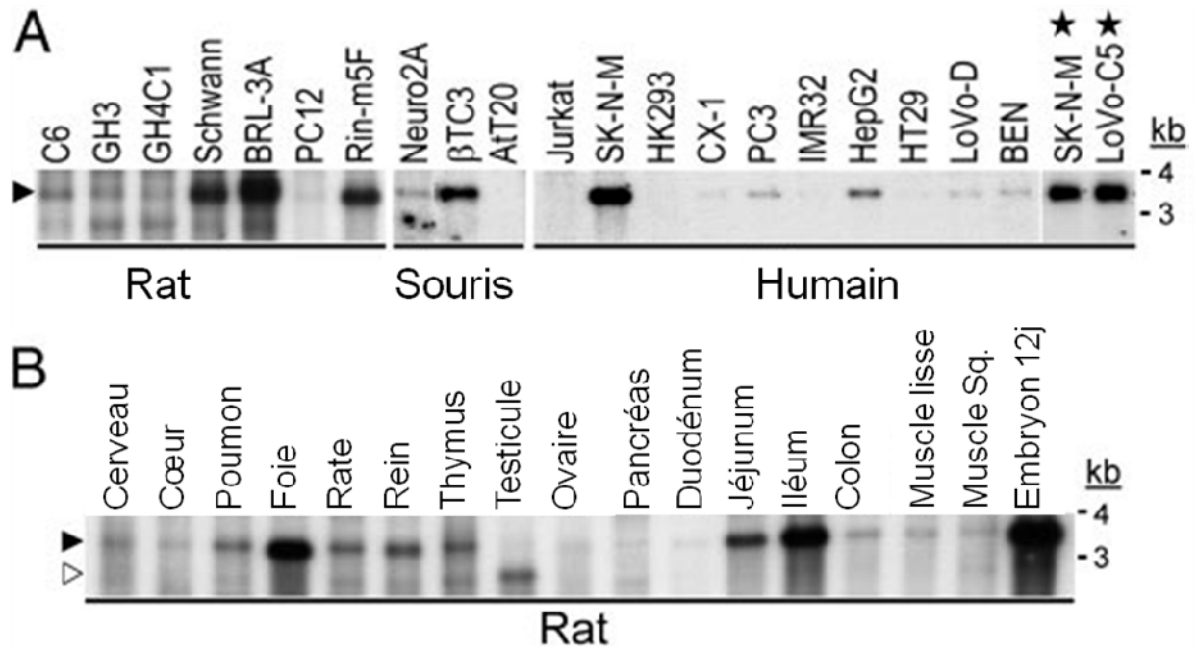


Figure 8. Analyse par *Northern blot* de l'ARNm de PCSK9 dans différents tissus. ARNm de PCSK9 dans 21 lignées cellulaires de rat, de souris et humaines (A) et 17 tissus de rat (B) (Muscle sq., muscle squelettique; j, jour). La flèche ouverte montre l'ARNm testiculaire plus court. Les étoiles indiquent un essai indépendant pour les cellules LoVo-C5. Tiré de Seidah *et al.* PNAS 2003 ⁴⁰.

Plus récemment, Zaid *et al.* ont confirmé ces résultats chez la souris (Figure 9) dans une analyse détaillée de l'expression de PCSK9 dans plusieurs tissus par PCR quantitatif (QPCR) ⁴⁹. La distribution tissulaire de PCSK9 est unique parmi les PC et suggère une implication dans l'hépatogenèse, la néphrogenèse et la neurogenèse ⁴⁰.

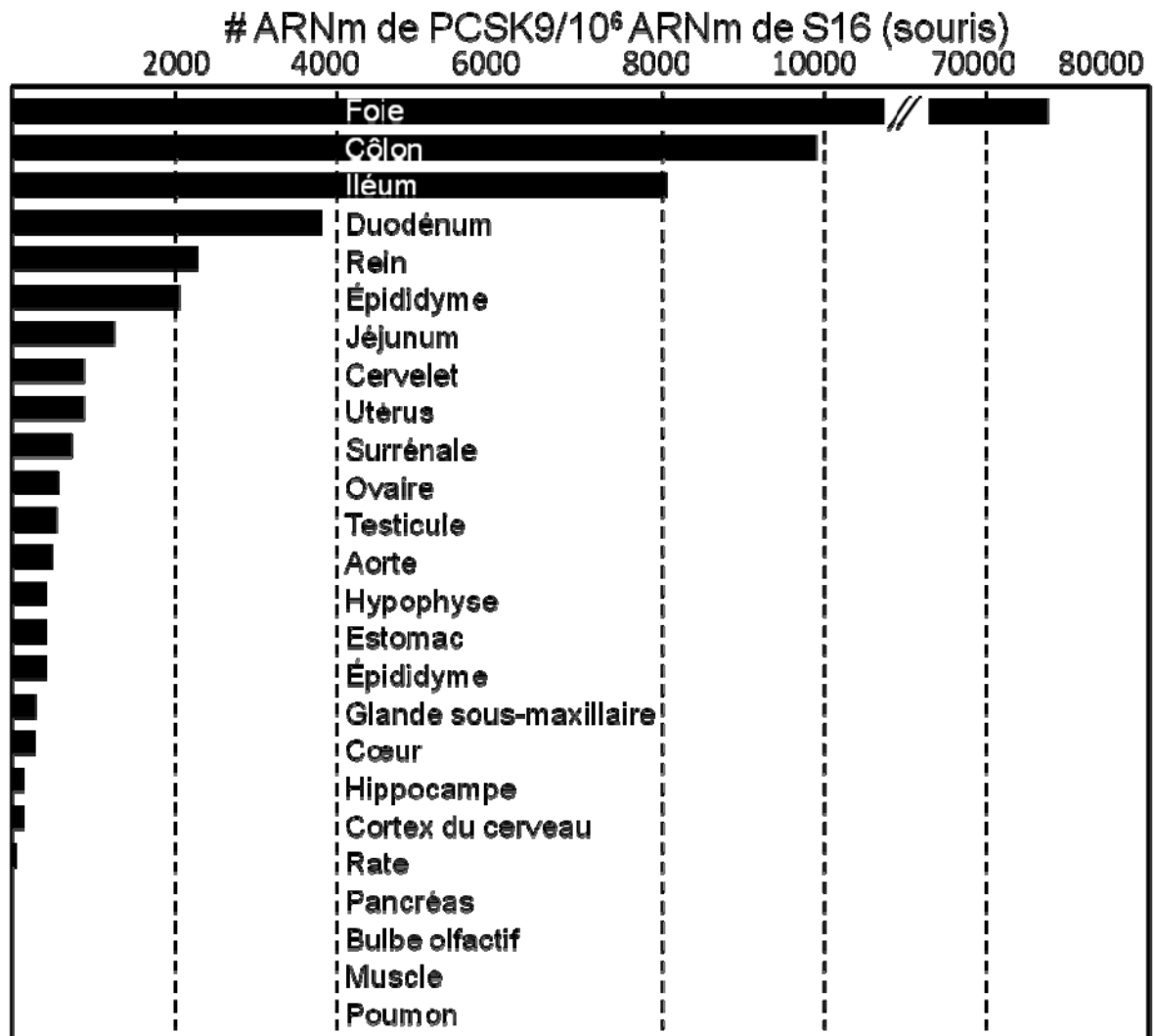


Figure 9. Analyse par QPCR de l'expression de PCSK9 normalisée par le niveau d'ARNm de la protéine ribosomale S16 dans des tissus de souris. Traduit de Zaid *et al.* Hepatology 2008 ⁴⁹.

3.4. Modèles tissulaires et animaux

L'observation que des mutations de PCSK9 causaient une hypercholestérolémie dominante tandis que la plupart des anomalies enzymatiques causent des désordres

récessifs a mené à suggérer un mécanisme de « gain-de-fonction »^{6,50}. La confirmation est venue d'une surexpression de PCSK9 chez la souris qui a doublé la concentration de cholestérol plasmatique et augmenté de 5 fois la concentration de cholestérol ne provenant pas des HDL tandis que cette surexpression n'avait aucun effet sur l'expression de l'ARNm du LDLR^{49,51}. De la même manière, la surexpression des mutants S127R et F216L de PCSK9 provoque une l'hypercholestérolémie due à une réduction de l'expression hépatique du LDLR⁵². Inversement, le foie des souris déficientes en PCSK9 (*Pcsk9*^{-/-}) montre une augmentation du LDLR qui mène à une réduction de 48% de la concentration de cholestérol plasmatique par rapport aux souris sauvages (WT)^{49,53}. De la même façon, l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens pour inhiber la PCSK9 chez la souris a résulté en une hausse des récepteurs LDL hépatiques et une baisse du cholestérol total et du LDL-C⁵⁴.

3.5. Régulation de l'expression de PCSK9

En 2003, tandis qu'on découvrait que le gène *PCSK9* était associé à l'HF, d'autres groupes montraient que chez les souris ayant une diète riche en cholestérol et chez celles sur-exprimant les formes nucléaires de SREBP-1a et SREBP-2, l'expression de la PCSK9 hépatique était régulée de la même manière que les gènes encodant les protéines impliquées dans l'homéostasie du cholestérol^{55,56}. Tout comme plusieurs autres gènes répondant aux stérols, la région promotrice de PCSK9 contient une séquence « SRE », la principale séquence de liaison du SREBP-2^{29,30}. La régulation de *PCSK9* par les SREBPs est identique à celle du *LDLR* décrite à la section 2.2. PCSK9 est donc très sensible aux changements de niveaux de stérols intracellulaires. Nous avons montré que les statines augmentaient l'expression de PCSK9 dans les cellules HepG2 et chez l'humain⁵⁷⁻⁵⁹. L'incubation des cellules HepG2 dans un milieu déficient en lipoprotéines augmente l'expression de l'ARNm et de la protéine de PCSK9 et du LDLR. Ces changements

corrèlent avec l'abondance de la forme nucléaire de SREBP-2, suggérant que ce facteur de transcription serait le principal activateur de l'expression de PCSK9³⁰. Une récente étude réalisée avec des cellules Caco-2/15, une lignée cellulaire d'épithélium intestinal humain, a montré que ces cellules répondent de manière similaire à l'addition et au retrait de stérols en termes de suppression et d'induction de PCSK9, LDLR et SREBP-2 nucléaires⁶⁰, indiquant que la régulation de *PCSK9* dans les cellules non-hépatiques se fait également par le mécanisme impliquant SREBP-2.

Certains facteurs nutritionnels pourraient moduler l'expression de PCSK9 *in vivo*. Chez la souris, les niveaux de PCSK9 en ARNm et protéine sont significativement réduits par le jeûne et retournent à la normale avec la prise d'une diète riche en glucides^{30,61}. L'expression du LDLR hépatique ne change pas durant le jeûne et diminue légèrement à la prise de nourriture, suggérant que la PCSK9, et non le LDLR, répondrait à l'apport de glucides³⁰. Ces résultats concordent avec ceux d'un clamp hyperinsulinémique-euglycémique chez des rongeurs, qui augmentait l'expression de PCSK9 *via* SREBP-1c⁶¹. D'autre part, l'induction du diabète chez le rat, par une injection de streptozotocine qui détruit les cellules β du pancréas, réduit considérablement l'expression hépatique de *PCSK9*⁶². Toujours chez le rat, le glucagon diminue de 70% de l'expression de PCSK9, tandis que l'insuline a un effet inverse⁶³. Bref, l'insuline semblerait induire l'expression de PCSK9 chez les rongeurs, possiblement *via* l'activation du facteur de transcription SREBP-1c.

Il a également été montré dans des hépatocytes humains que les acides biliaires, notamment l'acide chénodésoxycholique, diminuait l'expression et la synthèse protéique de PCSK9 *via* l'activation du récepteur X farnesoïde (FXR)⁶⁴. Finalement, des effets contradictoires ont été montrés avec le fénofibrate^{59,65-67}. En effet, des résultats chez la souris et l'humain suggèrent que les fibrates diminueraient l'expression de PCSK9^{65,66} tandis que d'autres résultats chez l'humain semblent démontrer une hausse de la concentration plasmatique de PCSK9 chez l'humain⁶⁸.

Récemment, un groupe a découvert que l'HNF1 α (*hepatocyte nuclear factor-1 α*) était le principal trans-activateur de la transcription de PCSK9 et qu'il agissait en collaboration avec SREBP-2^{69,70}.

Au niveau post-traductionnel, l'activité de PCSK9 peut aussi être régulée par inactivation protéolytique dans le Golgi/surface cellulaire par clivage par la furine/PC5A au résidu Arg218 générant une protéine soluble d'environ 53 kDa⁷¹. Cette forme est inactive et permet un clivage subséquent par la métalloprotéase ADAMTS-4 produisant un fragment d'environ 34 kDa⁷². Ces deux formes clivées de PCSK9 se retrouvent dans le plasma de la souris et de l'humain, suggérant que ces mécanismes de régulation détermineraient la quantité de PCSK9 active circulante.

3.6. Impact de PCSK9 sur le LDLR

Plusieurs observations ont mené à croire que PCSK9 fonctionnait comme un chaperon moléculaire pour prévenir le recyclage du LDLR et/ou amener le LDLR vers le lysosome pour fin de dégradation⁵⁰. PCSK9 pourrait effectuer son action autant de l'intérieur de la cellule que de l'extérieur en se liant au domaine EGF-A du LDLR et en le dirigeant vers le lysosome pour sa dégradation⁷³. La dégradation du LDLR par la PCSK9 est indépendante de son activité catalytique^{74,75}. L'activité enzymatique de PCSK9 semble être requise seulement pour son autoclivage qui est essentiel pour sa sécrétion par le foie^{41,49}. Par ailleurs, des études *in vitro* ont montré que la proPCSK9 pouvait s'associer à elle-même et que le domaine catalytique était responsable de la formation de ces polymères⁴⁰. Des études *in vitro* ont montré que la PCSK9 pouvait s'associer à elle-même dans des conditions spécifiques, dépendantes de la concentration de PCSK9, de la température et du pH. La présence d'un mélange de monomères, de dimères et de trimères de PCSK9 suggère une activité accrue de la dégradation du LDLR par rapport à la PCSK9 monomérique⁷⁶. Il

est également important de noter que la concentration de PCSK9 purifiée nécessaire pour induire la dégradation du LDLR (environ 500 ng/ml) correspond à une valeur au-dessus de la concentration moyenne de PCSK9 circulante mesurée dans le plasma humain ⁷⁷, suggérant que la concentration plasmatique de PCSK9 ne serait pas assez élevée pour induire de façon significative la dégradation du LDLR sur la surface des hépatocytes.

3.6.1. Liaison au LDLR

Des études de mutation ont démontré que la PCSK9 se liait au domaine EGF-A du LDLR ⁷³. Cette liaison hautement localisée de PCSK9 au domaine EGF-A est frappante, car des domaines EGF-like sont retrouvés dans une multitude de protéines. Malgré cette présence quasi-ubiquitaire des domaines EGF-like, plusieurs données suggèrent que PCSK9 se lie de façon spécifique au LDLR. Premièrement, PCSK9 se lie peu ou pas du tout aux cellules n'exprimant pas le LDLR ⁷⁷. Deuxièmement, le seul phénotype apparent chez les souris transgéniques pour PCSK9 est une hypercholestérolémie secondaire à une déficience en LDLR, malgré une augmentation de plus de 30-100 fois du niveau plasmatique de PCSK9 ⁴⁹. Troisièmement, l'absence de PCSK9 chez la souris ^{49,53} et l'humain ⁷⁸ n'a pas d'autre phénotype clair que celui relié au récepteur LDL.

Pour déterminer les critères de cette sélectivité, des résidus conservés du domaine EGF-A du VLDLR ont été remplacés par les acides aminés correspondants du LDLR, ce qui a permis d'identifier que le résidu leucine à la position 318 était responsable de la liaison à PCSK9 ⁷³. Cette leucine (Leu318) se situe entre les troisième et quatrième cystéines (Cys317 et Cys319) du domaine EGF-A, qui sont toutes les deux liées par des ponts disulfures à d'autres cystéines. Aucun des autres membres de la famille du LDLR ne présente une leucine à cette position. L'introduction de cette leucine dans le VLDLR (résidu 354) a été suffisante pour permettre la liaison de PCSK9 au VLDLR. Par conséquent, la Leu318 contribuerait à la spécificité de liaison de la PCSK9 au LDLR. Par

contre, vu que plusieurs autres protéines contiennent une leucine à cette position dans leur domaine EGF-like, ce résidu ne peut pas être le seul déterminant de la liaison PCSK9–LDLR.

L'élucidation de la structure cristalline de PCSK9 a permis d'établir les sites de liaison au domaine extracellulaire du LDLR ^{79,80}. Le site de liaison au domaine EGF-A du LDLR est situé sur la surface de PCSK9 et est formé des acides aminés 367 à 381. Le pro-domaine et le domaine C-terminal CHRD de PCSK9 n'interagissent pas avec l'EGF-A. Un feuillet β antiparallèle se forme entre les résidus 377-379 de PCSK9 et 308-310 de l'EGF-A. De plus, des interactions clés avec l'EGF-A sont faites par les résidus Arg194 et Asp238 de PCSK9 (Figure 10) ⁸¹. L'interface entre PCSK9 et l'EGF-A est principalement hydrophobe et présente des interactions polaires spécifiques autour de cette interface. La Phe379 de PCSK9 est au centre de cette interface hydrophobe et fait de nombreux contacts avec l'EGF-A. D'autres résidus de PCSK9 contribuent à l'interface hydrophobe, incluant Ile369 et Cys378, qui lient la Leu318 de l'EGF-A. De nombreux ponts salins et liens hydrogène formés entre PCSK9 et l'EGF-A contribueraient à la spécificité de la liaison avec l'EGF-A du LDLR plutôt qu'au EGF-like des autres protéines. Les liens hydrogène entre Asp238 de PCSK9 et Asn295 de l'EGF-A, Thr377 de PCSK9 et Asn309 de l'EGF-A, et le pont salin entre Ser153 de PCSK9 et Asp299 de l'EGF-A contribuent à cette spécificité ⁸¹.

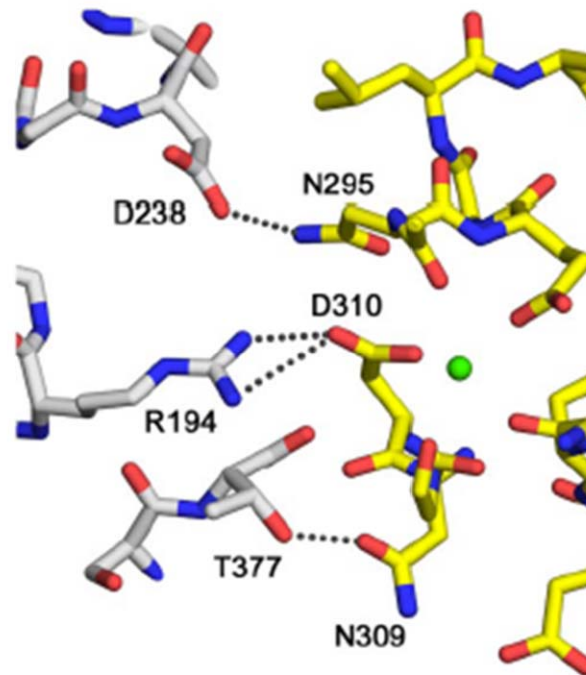


Figure 10. Interface entre la PCSK9 et le domaine EGF-A du LDLR. Interactions entre la PCSK9 (en gris) et l'EGF-A (en jaune) près du site de liaison du calcium (sphère verte) de l'EGF-A. Les couleurs correspondent au type d'élément : rouge, oxygène; bleu, azote. Tiré de Kwon & Lagace, PNAS, 2008 ⁸¹.

Il a également été observé que la présence de calcium était nécessaire à la liaison PCSK9–LDLR. En effet, des substitutions des acides aminés de l'EGF-A du LDL-R, connus pour coordonner la liaison du calcium (Asn295, Glu296 et Asp310) empêchent la liaison de la PCSK9 au LDLR ⁷³. De plus, l'affinité entre PCSK9 et le LDLR semble plus forte dans les endosomes à cause d'une augmentation de l'acidité ⁸². Une étude de liaison a démontré que la liaison de PCSK9 au LDLR était 50 fois plus forte à un pH de 5,2 qu'à un pH de 7,0, suggérant que PCSK9 lie le LDLR plus fermement après son internalisation. Donc, à cause de cette affinité accrue, l'incapacité de relâcher PCSK9 peut entraver le recyclage du LDLR et réduire son nombre à la surface cellulaire ⁷⁹.

Le site de liaison de PCSK9 au LDLR est distinct de la région de liaison au ligand (domaine LA ou R1-R7) qui reconnaît les lipoprotéines LDL et β -VLDL. La suppression du domaine entier de liaison au ligand n'affecte pas significativement la liaison de PCSK9 au LDLR ⁷³. Donc, PCSK9 peut lier le LDLR indépendamment des lipoprotéines. Cependant, nous ne savons pas si le LDLR peut lier une lipoprotéine et PCSK9 simultanément ou si la PCSK9 qui lie le LDLR *in vivo* est associée à une lipoprotéine ou non. De plus, il reste à déterminer si la liaison de PCSK9 à l'EGF-A du LDLR peut affecter la liaison de lipoprotéines.

Plusieurs résultats indiquent que PCSK9 redirige le LDLR vers le lysosome plutôt que vers la voie de recyclage, mais le mécanisme moléculaire n'est pas encore clairement défini. Une possibilité serait que PCSK9 contienne un signal de transport au lysosome, mais ce modèle ne corrèle pas avec le fait que la liaison de PCSK9 au LDLR est nécessaire mais non suffisante à la dégradation du récepteur. En effet, un LDLR dépourvu de son domaine de liaison au ligand ou du domaine *β -propeller* (YWTD) peut lier PCSK9 et entrer dans l'endosome, mais n'est pas sujet à une dégradation induite par PCSK9 ⁸³. L'explication la plus plausible serait que la liaison de PCSK9 au LDLR prévienne le changement de conformation requis par le récepteur pour le recyclage. Il est connu que des mutations du *LDLR* dans le domaine du *β -propeller* (mutations de classe 5) peuvent interrompre le recyclage du récepteur et sont associées à un renouvellement rapide du récepteur ³. En présence d'un pH acide, la cristallisation de la portion extracellulaire du LDLR a montré une association physique entre les domaines R4 et R5 avec le domaine *β -propeller*. Donc, PCSK9, en se liant à l'EGF-A situé entre ces deux domaines pourrait empêcher cette association physique, prévenant ainsi ce changement de conformation dépendant du pH. Des études ont démontré que PCSK9 prévenait effectivement ce changement de conformation, mais la découverte que R4 et R5 ne sont pas requis pour la dégradation du LDLR suggère que ce modèle est plus complexe que prévu. La seule prévention du changement de conformation à pH acide du LDLR par PCSK9 n'est pas

suffisante pour expliquer l'action de PCSK9⁸³. De plus amples études seront donc nécessaires pour élucider ce mécanisme aux niveaux moléculaire et cellulaire.

3.6.2. Liaison de PCSK9 au VLDLR, à l'ApoER2 et à l'annexine A2

3.6.2.1. VLDLR et ApoER2

Des résultats contradictoires ont été rapportés en ce qui concerne la capacité de PCSK9 d'interagir avec des protéines autres que le LDLR. En effet, Zhang *et al.* ont montré qu'on ne pouvait détecter de liaison entre PCSK9 et le VLDLR dans les cellules COS-M transfectées, tel que décrit dans la section précédente⁷³. Par contre, Poirier *et al.* ont montré que PCSK9 pouvait se lier aux récepteurs ApoER2 et VLDLR et ce, d'une manière indépendante du LDLR et de l'activité catalytique de PCSK9⁸⁴. En effet, à l'aide de cellules CHO-A7, déficientes en LDLR endogène et exprimant de façon stable les récepteurs ApoER2 et VLDLR, ces auteurs ont démontré que la présence de ces récepteurs augmentait la capacité d'association de PCSK9 aux cellules, suggérant une liaison directe ou indirecte. Les données de Zhang *et al.* montrent qu'après 2 heures d'incubation des cellules COS-M avec la PCSK9 exogène, seules les cellules exprimant le LDLR *versus* le VLDLR liaient la PCSK9. Les travaux de Poirier *et al.* montrent qu'une incubation pendant 16 heures des cellules CHO-A7 avec la PCSK9 exogène résultait en une association accrue de PCSK9 aux cellules et qu'une co-expression de PCSK9 avec des récepteurs ApoER2 et VLDLR provoquait une augmentation de la dégradation de ceux-ci⁸⁴. Il serait donc possible que PCSK9 ait une affinité plus élevée pour le LDLR *versus* l'ApoER2 et le VLDLR et/ou que ces interactions dépendent du type cellulaire. Après vérification, cette dégradation accrue a pu être observée dans six lignées cellulaires différentes, mais pas dans les cellules COS-1, suggérant que la dégradation observée pourrait dépendre de facteurs

cellulaires spécifiques tels que l'ARH pour le LDLR et Dab1 pour l'ApoER2 et le VLDLR⁸⁵.

Par ailleurs, pour déterminer l'interaction entre PCSK9 et les récepteurs ApoER2 et VLDLR d'une manière plus directe, Shan *et al.*⁸⁶ ont utilisé un essai de liaison acellulaire « *Alphascreen* » (*Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay*; Perkin-Elmer), capable de déterminer directement l'interaction entre PCSK9-FLAG et un présumé partenaire de liaison. Cette technique requiert que des billes liées à un « donneur » et à un « accepteur » se retrouvent à proximité *via* une interaction protéine-protéine pour produire une augmentation de luminescence⁸⁷. Grâce à cette technique, une liaison dépendante de la concentration entre PCSK9 et les récepteurs LDLR, ApoER2 et le VLDLR de la souris (mVLDLR) a été observée. De plus, ce groupe a démontré qu'un peptide EGF-A pouvait inhiber la dégradation du LDLR par la PCSK9 dans les cellules HepG2. Ce peptide était même capable d'inhiber la liaison de PCSK9 au mVLDLR, tandis que la liaison à l'ApoER2 était moins affectée. Par contre, la protéine associée au LDLR (RAP), qui interagit avec les domaines de répétitions de type A (LA) du LDLR, a inhibé de façon plus efficace la liaison de PCSK9 à l'ApoER2 que la liaison avec le LDLR ou le mVLDLR⁸⁶. Ces résultats démontrent que, bien que PCSK9 lie plusieurs récepteurs par l'intermédiaire de leur EGF-A, des contacts supplémentaires avec d'autres domaines de ces récepteurs sont aussi impliqués.

3.6.2.2. Annexine A2

Une étude très intéressante a rapporté pour la première fois la présence d'un inhibiteur endogène de la PCSK9. En effet, par des techniques de « Far Western blotting », de co-immunoprécipitation et de « *pull-down* », Mayer *et al.*⁸⁸ ont démontré que l'annexine A2 (AnxA2), *via* son domaine R1, pouvait se lier au domaine CHRD de la PCSK9, prouvant ainsi l'existence d'une nouvelle voie de régulation pour empêcher la dégradation

du LDLR par la PCSK9. L'annexine A2 (AnxA2) est une protéine d'environ 33 kDa qui fait partie de la famille des annexines. Les annexines sont des protéines qui possèdent une double localisation cellulaire cytosolique et membranaire. Elles font le lien entre la signalisation calcique et la dynamique membranaire, deux fonctions impliquant un même mécanisme de base ; leur liaison est réversible et dépendante du Ca^{2+} . L'AnxA2 est structurée en 2 domaines : le cœur qui contient les sites de liaison au Ca^{2+} responsables de la liaison aux membranes, et le domaine N-terminal qui possède le site de liaison à la protéine S100A10 avec laquelle elle forme un tétramère. En présence du Ca^{2+} , l'AnxA2 se lie aux membranes plasmiques *via* des phospholipides anioniques tels que la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI) et provoque aussi l'agrégation de ces membranes. L'AnxA2 est impliquée dans les phénomènes d'exocytose et d'endocytose, de coagulation, d'interactions membrane-cytosquelette (actine) et de formation des jonctions intercellulaires ⁸⁹.

Il a été démontré que l'AnxA2 soluble pouvait réduire la quantité de PCSK9 sur la surface cellulaire, et qu'une surexpression d'AnxA2 dans les cellules HepG2 provoquait une augmentation du niveau de LDLR sur la surface cellulaire ⁸⁸. Les résultats obtenus démontrent donc que l'activité de PCSK9 sur le LDLR pourrait être inhibée par la liaison à l'AnxA2. La liaison de PCSK9 à l'AnxA2 pourrait, possiblement, causer des changements structuraux allostériques dans le domaine catalytique de PCSK9, affectant ainsi sa capacité à induire la dégradation du LDLR. Cependant, on ne sait pas si le complexe PCSK9/AnxA2 est internalisé dans les endosomes/lysosomes ni si l'interaction CHRD/AnxA2 prévient l'internalisation du complexe PCSK9/LDLR.

L'analyse de l'expression de l'ARNm de l'AnxA2 dans des lignées cellulaires humaines par PCR quantitatif a révélé que l'AnxA2 est exprimée dans la plupart des lignées et surtout dans les cellules épithéliales. Fait intéressant, dans l'intestin et le foie, les niveaux d'ARNm d'AnxA2 et de PCSK9 semblaient être l'inverse l'un de l'autre, PCSK9 étant fortement exprimé dans le foie, mais non l'AnxA2 et l'AnxA2 étant abondante dans le

jéjunum et non la PCSK9. L'AnxA2 est également très abondante sur la surface des cellules endothéliales, incluant celles des poumons, de l'intestin grêle et des surrénales. Ceci pourrait expliquer l'incapacité de PCSK9 à dégrader le LDLR des surrénales, même lorsqu'injecté en grande quantité ⁹⁰, ainsi que la courte durée de demi-vie de PCSK9, qui n'est due qu'en partie à la présence du LDLR ⁹⁰. L'incapacité de PCSK9 à détruire le LDLR dans les fibroblastes et les cellules COS-7 ⁷³ pourrait également être causée par leur expression élevée d'AnxA2.

Bref, l'identification du domaine R1 de l'AnxA2 qui se lie à la PCSK9 procure un outil potentiel pour réguler la fonction de PCSK9. Des dérivés de ce segment pourraient être utilisés pour inhiber la fonction de PCSK9 sur le LDLR et possiblement ses autres cibles, comme le VLDLR et l'ApoER2.

3.7. Site d'action de PCSK9 dans la cellule

La principale question portant sur le mécanisme d'action de PCSK9 était donc : PCSK9 agit-elle sur le LDLR de l'intérieur ou de l'extérieur de la cellule?

Il a été démontré que PCSK9 liait le LDLR pour promouvoir sa dégradation dans le lysosome. L'internalisation de PCSK9 à partir de la surface cellulaire est dépendante de la présence du LDLR et de la protéine adaptatrice ARH qui lie la queue cytosolique du LDLR ^{77,91,92}, ce qui indique que le mécanisme débiterait à l'extérieur de la cellule, sur la surface cellulaire. Par contre, il a également été démontré que le LDLR et la proPCSK9 interagissaient tôt dans la voie sécrétoire ⁹³, que PCSK9 était capable de dégrader le LDLR en absence de l'ARH ⁵², et que des chimères PCSK9-Lamp1, qui migrent du RE directement aux endosomes tardifs/lysosomes, pouvaient induire la dégradation du LDLR, VLDLR et ApoER2 ⁸⁴. Ces observations suggèrent donc également la présence d'une voie intracellulaire pour la dégradation du LDLR par PCSK9.

La voie intracellulaire de dégradation du LDLR par la PCSK9 a été étudiée plus en profondeur par Poirier *et al.*⁹⁴. Ils ont démontré qu'une inhibition du transport du *trans* Golgi vers le lysosome, en utilisant un siRNA spécifique à la chaîne légère de la clathrine, augmentait l'expression du LDLR dans les HepG2 selon un mécanisme dépendant de PCSK9. À l'inverse, en bloquant la voie extracellulaire d'endocytose/dégradation du LDLR, en utilisant soit le Dynasore (un inhibiteur de la GTPase qui cible la dynamine et bloque l'endocytose), un peptide EGF-AB ou en supprimant l'ARH, l'expression du LDLR n'étaient pas significativement affectée. Les résultats obtenus dans cette étude, à partir des cellules HepG2 et d'hépatocytes primaires de souris démontrent que la PCSK9 endogène peut dégrader le LDLR autant par la voie intracellulaire qu'extracellulaire.

4. L'hypercholestérolémie familiale : signes cliniques

L'hypercholestérolémie familiale (HF) hétérozygote (HTZ) est un désordre monogénique à transmission autosomale co-dominante, qui affecte une personne sur 500, avec une plus grande prévalence dans certaines populations comme les Canadiens-Français du Québec, les Libanais et les Afrikaners ⁹⁵ à cause d'un effet fondateur. Tandis que la forme hétérozygote est relativement commune, la forme homozygote est très rare, affectant un individu sur 1 million. La principale caractéristique de cette maladie est une concentration plasmatique très élevée du cholestérol des lipoprotéines de faible densité (LDL-C), habituellement au-dessus du 95^e percentile, après ajustement pour l'âge et le sexe ⁹. La conséquence la plus néfaste de l'hypercholestérolémie est la maladie coronarienne qui survient de façon précoce. Si l'HF n'est pas diagnostiquée et pas traitée, le risque cumulatif de maladie coronarienne à l'âge de 60 ans est de plus de 60% chez les hommes et de 30% chez les femmes atteints d'HF hétérozygote ⁹⁶. Au Québec, l'apparition de la maladie coronarienne se fait environ à l'âge de 40 ans chez l'homme et à 50 ans chez la femme ⁹⁷. D'après l'OMS (Organisation mondiale de la santé), seulement 15% des Canadiens atteints d'HF HTZ sont diagnostiqués ⁹⁸. De plus, 30% des patients ne survivent pas à leur premier infarctus du myocarde. La détection précoce et le traitement rapide de l'hypercholestérolémie familiale hétérozygote auraient donc le potentiel de sauver de nombreuses vies et de prévenir les conséquences morbides reliées à la maladie coronarienne.

Manifestations cliniques

Les caractéristiques de l'hypercholestérolémie familiale sont énumérées dans le tableau 3 ⁹⁹. Les manifestations cliniques de l'HF HTZ découlent toutes d'une hypercholestérolémie marquée et présente depuis la naissance, due à la capacité réduite du foie à cataboliser les LDL. Par conséquent, le temps de résidence de ces lipoprotéines dans le plasma est prolongé et la proportion de particules oxydées augmente. Celles-ci sont ensuite internalisées par les macrophages *via* les récepteurs éboueurs (*scavenger receptors*) ce qui cause la formation de cellules spumeuses, des macrophages engorgés de cholestérol. Ce phénomène peut mener à plusieurs manifestations cliniques. Premièrement, les patients

HTZ ont généralement un taux de LDL-C de 2 à 3 fois supérieur à la normale. Des dépôts de cholestérol, appelés xanthomes, peuvent alors se former dans les tendons extenseurs (xanthomes tendineux). Ils se manifestent tout d'abord par un épaissement des tendons, puis par des dépôts formant une protubérance. On peut en retrouver notamment sur les mains, les pieds, les coudes et les genoux. Les xanthomes tendineux sont retrouvés chez >70% des patients HF ayant atteint l'âge de 50 ans. En plus des dépôts aux tendons, on peut également en retrouver sous la peau, notamment aux paupières (xanthélasma), au pourtour de la cornée (arc ou anneau cornéen) et au niveau des artères coronaires et périphériques (athérosclérose), où ils ont le potentiel de causer l'angine de poitrine, l'infarctus du myocarde (IM), la claudication et l'accident cérébro-vasculaire (ACV) ⁹. Évidemment, les patients homozygotes présentent un profil beaucoup plus sévère, avec un taux de LDL-C de 6 à 8 fois supérieur à la normale et souvent des complications vasculaires de l'athérosclérose avant l'âge de 20 ans.

Tableau 3. Caractéristiques de l'hypercholestérolémie familiale. Tiré de Davignon & Dufour, Primary Hyperlipidemias, 2007 ⁹⁹.

Caractéristiques de l'hypercholestérolémie familiale (HF)

1. Hypercholestérolémie sévère
 2. LDL-C au-dessus du 95^e percentile
 3. Histoire familiale de maladie coronarienne précoce, autre maladie vasculaire athérosclérotique et manifestations typiques d'HF
 4. Xanthomes tendineux ou autres formes de dépôts de lipides
 5. Manifestations précoces d'athérosclérose
 6. Hérité autosome co-dominante et pénétrance élevée
 7. Un défaut du récepteur LDL avec clairance retardée des LDL
-

Le diagnostic clinique de l'HF se base principalement sur une cholestérolémie des LDL supérieure au 95^e percentile pour l'âge et le sexe, une histoire familiale et/ou individuelle de maladie coronarienne précoce et la présence de xanthomes tendineux ¹⁰⁰. L'HF peut également être diagnostiquée suite à la confirmation de mutation, par biologie moléculaire, dans un gène causant l'HF. Cependant, le diagnostic est avant tout clinique. La non-identification de mutation n'exclut donc pas le diagnostic ⁷. Le traitement principal, en plus d'une diète visant à réduire la concentration de cholestérol plasmatique, est l'usage de « statines », qui inhibent la synthèse de cholestérol et augmentent la production du récepteur des LDL.

4.1. Mutation du LDLR

On a longtemps cru que l'hypercholestérolémie familiale était causée par une augmentation de la synthèse de cholestérol, mais des mesures du métabolisme des LDL dans l'organisme ont montré que les patients présentaient un catabolisme réduit des LDL ¹⁰¹. Cette hypercholestérolémie était donc due à un défaut de clairance des LDL et non à un défaut des LDL ou à une surproduction de cholestérol. Par la suite, les travaux de Brown et Goldstein ont permis de découvrir le récepteur des LDL (LDLR) et que des mutations du *LDLR* causaient l'HF ⁹.

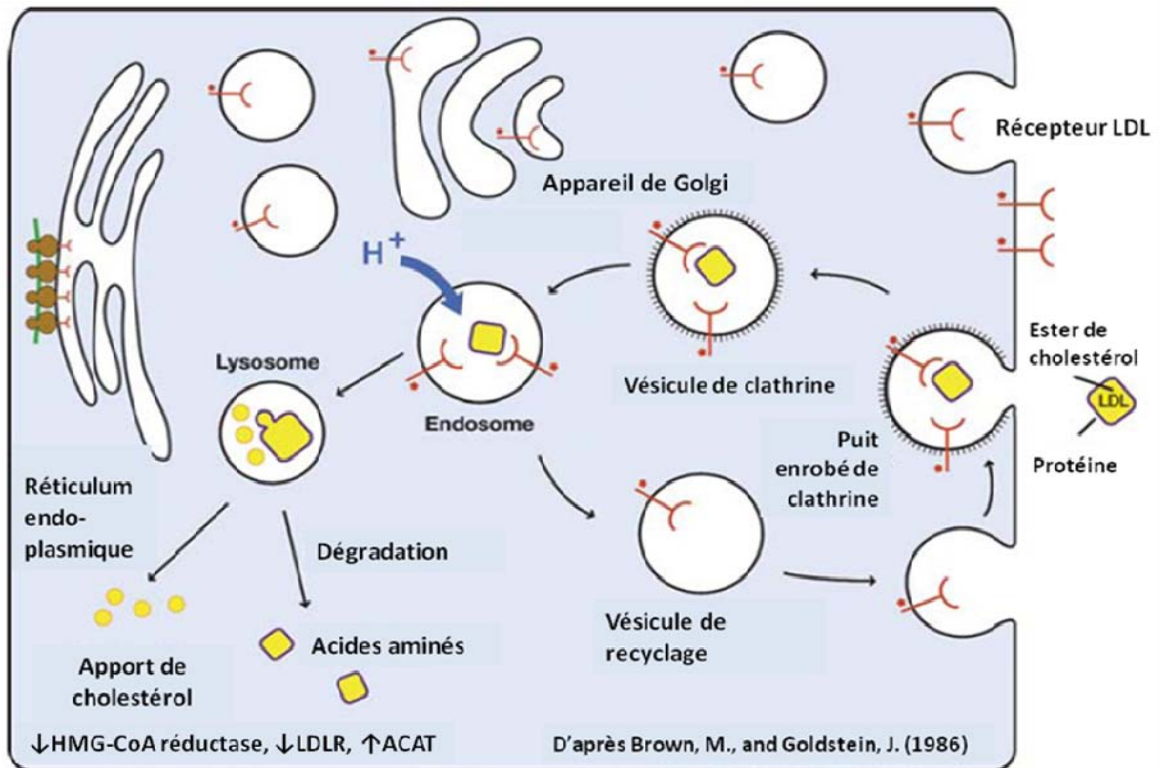


Figure 11. Schéma illustrant l'internalisation des lipoprotéines par le LDLR. Adapté de Jeon H & Blacklow SC, Ann Rev Biochem 2005 ¹⁰.

Le gène codant pour le LDLR, situé sur le chromosome 19, est constitué d'environ 45 kb et est composé de 18 exons. Chaque domaine du récepteur est codé par une série d'exons : le peptide signal est codé par l'exon 1 ; le domaine de liaison au ligand correspond aux exons 2 à 6, les exons 7 à 14 codent pour le domaine d'homologie à l'EGF ; l'exon 15 code pour le domaine de *O*-glycosylation ; l'exon 16 et le début de l'exon 17 codent pour le domaine transmembranaire ; et la fin de l'exon 17 et l'exon 18 codent pour le domaine cytoplasmique ⁹. Présentement, plus de 1 000 variations alléliques du LDLR ont été identifiées (<http://www.ucl.ac.uk/fh/>) et classées en 5 catégories, selon la région du récepteur affectée ¹⁰².

4.1.1. Classes de mutations

Mutations de classe 1 : Allèles nuls

Les LDLR de fibroblastes portant une mutation de classe 1 du *LDLR* ont moins de 2% de l'activité normale de liaison, d'internalisation et de dégradation des LDL. Dans ces cellules, il n'y a pas de rétrorégulation négative par le cholestérol sur l'activité de l'HMG-CoA réductase ni sur la synthèse de cholestérol, ce qui mène à une surproduction de cholestérol. Ces mutations sont de types multiples : délétion du promoteur, modification d'acides aminés, création de codons non-sens, modification du cadre de lecture et changement des jonctions intron/exon³.

Mutations de classe 2 : Allèles avec défaut de transports

Ce type de mutation est généralement causé par une modification d'acide aminé ou une délétion qui causent un mauvais repliement du récepteur lors de sa synthèse dans le RE. Il existe deux sous-classes pour les mutations de classe 2. Les allèles de classe 2B sont plus communs et une portion variable du récepteur synthétisé se rend à l'appareil de Golgi puis à la surface, mais à une vitesse très réduite. Évidemment, la proportion de ces récepteurs qui se rendent à la surface est grandement diminuée. Les allèles de classe 2A quant à eux produisent une protéine qui est incapable de sortir du RE. La qualité des protéines repliées dans le RE est surveillée soigneusement pour s'assurer que les protéines mal repliées ou non-assemblées soient retenues dans le RE et éventuellement dégradées par un processus nommé ERAD (*ER-associated degradation*)¹⁰³. Dans ce mécanisme, des chaperons moléculaires et des protéines de type lectine sont impliquées dans l'identification de protéines mal repliées et de réductases résidentes du RE clivent les ponts disulfures de ces protéines pour faciliter un transport rétrograde vers le cytosol. Par la suite, des adénosines triphosphatases AAA+ retirent ces peptides du canal de rétro-translocation vers le cytosol où ils sont dégradés par le système ubiquitine/protéasome³.

Mutations de classe 3 : Allèles avec défaut de liaison au ligand

Des délétions, insertions et changement d'acides aminés peuvent altérer la reconnaissance du ligand par le LDLR. Ainsi, le récepteur se rend à la surface cellulaire, mais est incapable de lier ni l'apoB ni l'apoE des lipoprotéines³.

Mutations de classe 4 : Allèles avec défaut d'internalisation

Ces mutations sont plutôt rares et affectent le domaine cytoplasmique du LDLR qui régule le trafic intracellulaire du LDLR *via* l'endocytose et le transfert aux endosomes dans les vésicules de clathrine et ensuite aux lysosomes. Lors de mutation, codon « stop » précoce ou changement d'acide aminé, le récepteur lie toujours la LDL, mais ne peut s'internaliser par voie endosomale³.

Mutations de classe 5 : Allèles avec défaut de recyclage

Le domaine d'homologie au précurseur du facteur de croissance (*EGF-like*) est essentiel pour la dissociation du ligand en milieu acide, suite à l'internalisation dans les endosomes. Cette étape est nécessaire pour le recyclage du récepteur. Si une mutation de ce domaine empêche la dissociation du ligand, le récepteur est alors dégradé dans les lysosomes avec son ligand³.

Mise à part la différence dramatique existant entre les profils cliniques des HTZ et des HMZ, une certaine variabilité existe parmi les HTZ et les HMZ. En effet, chez les HTZ, les patients porteurs de mutation de classe 1 (moins de 2% de l'activité normale) tendent généralement à avoir un profil clinique plus sévère que les patients porteurs des autres types de mutations. Les types de mutations des classes 2 à 5 présentent une certaine activité du LDLR, tel que l'allèle porteur de la mutation W66G qui conserve environ 25% de son activité normale. Cette différence d'activité du LDLR entre les classes de mutation est évidemment plus marquée chez les HMZ¹⁰⁴.

4.2. Mutation de l'apolipoprotéine B-100

La déficience familiale en apolipoprotéine B-100 (*familial defective apoB-100*; FDB) est un désordre monogénique à transmission autosome dominante avec une pénétrance incomplète et une expression phénotypique variable, due à une mutation faux-sens dans le gène *APOB* sur le chromosome 2 (2p23-p24)^{99,105}. Comme il a été mentionné précédemment, l'apoB-100 est la seule apolipoprotéine associée aux LDL et représente le ligand du LDLR. Par conséquent, une mutation affectant l'affinité de l'apoB pour son récepteur résulte en une clairance retardée des particules de LDL-apoB avec un temps de résidence ~3,6 fois plus long que chez les sujets normolipidémiques (8,2 vs 2,3 jours)⁹⁹. Jusqu'à présent, 5 mutations du gène dans l'exon 26, codant pour le site de liaison au LDLR, peuvent causer cette condition : R3500Q (la première mutation commune identifiée), R3500W, R3531C, R3480W et T3492I⁹⁹.

La prévalence de FDB varie largement d'un pays à l'autre, allant de 1:209 à 1:230 en Suisse à une absence totale chez les populations turques ou finlandaises. Chez les caucasiens des États-Unis et d'Europe, elle est en moyenne de 1:500 à 1:700⁹⁹. Les caractéristiques cliniques de la FDB sont également très variables en fonction principalement de la sévérité de l'hypercholestérolémie et de la présence de facteurs génétiques et/ou environnementaux influençant le risque cardiovasculaire.

4.3. Mutation de PCSK9

En 2003, Abidadel *et al*⁶ ont identifié chez des familles françaises des mutations de PCSK9 (S127R et F216L) qui ségrégaient avec une hypercholestérolémie autosome dominante (ADH). Suite à cette découverte, le gène *PCSK9* a été identifié comme 3^e locus impliqué dans l'ADH, en plus du *LDLR* et de l'*APOB*, avec une incidence de 2,3% parmi

les sujets atteints d'ADH (Figure 12). Plus tard, Cohen *et al*¹⁰⁶ ont identifié 2 mutations non-sens (Y142X, C679X, X=codon stop) associées avec une hypocholestérolémie chez des sujets de race noire. Ces dernières sont donc des mutations de perte de fonction, car la protéine n'est pas produite, tandis que les premières sont des mutations causant un gain d'activité, car elles produisent le même effet qu'une surexpression de PCSK9. Jusqu'à maintenant, ~70 variations d'acides aminés de PCSK9 ont été rapportées, mais seulement quelques unes des ces variations ont démontré un effet significatif sur le niveau de LDL-C plasmatique (http://www.ucl.ac.uk/ldlr/LOVDv.1.1.0/index.php?select_db=PCSK9).

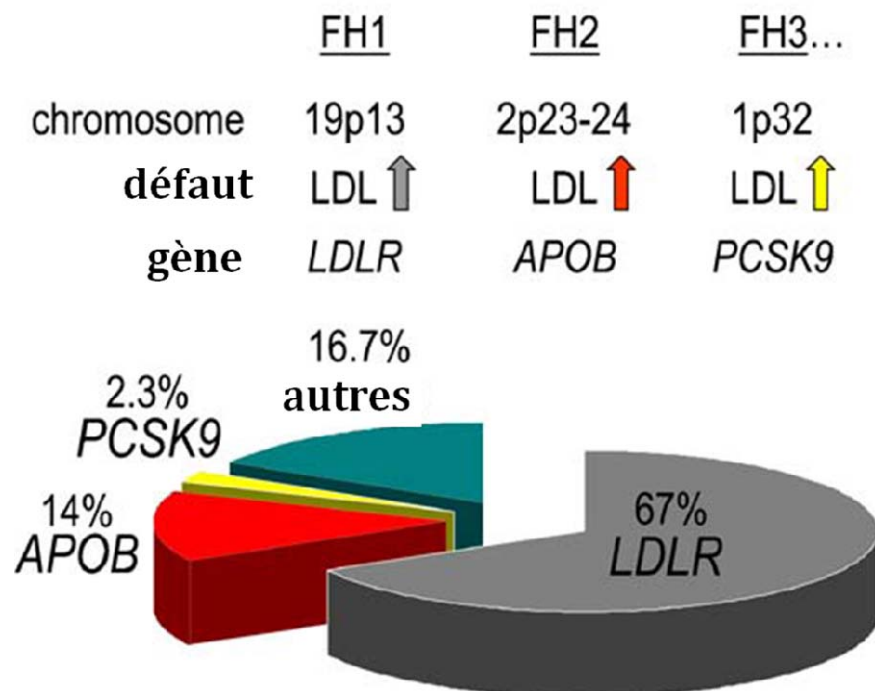


Figure 12. Incidence des mutations de *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* et des autres gènes dans l'HF. Traduit de Seidah & Prat, J Mol Med 2007⁴⁷.

L'hypercholestérolémie causée par une mutation de PCSK9 est décrite de façon détaillée dans la section 4.8.

4.4. Traitements

Le LDLR est le principal médiateur du catabolisme final des LDL en effectuant son internalisation. Le cholestérol qui entre dans la cellule est estérifié par l'« acyl-CoA : cholestérol acyltransférase » (ACAT), et entreposé dans des microsomes. L'influx de cholestérol cellulaire *via* le LDLR mène à trois mécanismes coordonnés : une diminution de la synthèse de cholestérol et du LDLR, ainsi qu'une augmentation de la synthèse de CE. Cette régulation par rétrocontrôle est principalement due à l'action de facteurs de transcription liés à la membrane appelés « *sterol regulatory element-binding protein* » (SREBP), qui affectent la transcription de gènes impliqués dans la biosynthèse des stérols, comme la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) synthase, l'HMG-CoA réductase et le LDLR, ainsi que dans la biosynthèse d'acides gras ¹⁰⁷. Il est connu qu'une augmentation de la concentration de LDL plasmatique et d'apoB est associée à une augmentation de l'athérosclérose et du risque de maladie coronarienne. Par conséquent, il est important de maintenir une concentration de LDL basse. Voici les principaux moyens pharmaceutiques d'y parvenir.

4.4.1. Statines

L'utilisation d'inhibiteurs de l'HMGCoA réductase (statines) est généralement prescrite en cas d'hypercholestérolémie où on observe une augmentation isolée du cholestérol des LDL (type IIa) ou associée à une hypertriglycéridémie (augmentation des LDL et des VLDL [type IIb] ou lorsqu'elle est associée à une augmentation des résidus de lipoprotéines (*remnants*, IDL) [type III]) ¹⁰⁸. Le principal effet des statines sur le profil lipidique est une réduction de la concentration de LDL-cholestérol (de 20 à 50%). On observe également une diminution des triglycérides et des résidus de chylomicrons (*remnants*), ainsi qu'une augmentation du HDL-cholestérol de 5 à 10% ¹⁰⁹.

Les statines agissent principalement en augmentant la capture hépatique des LDL favorisant ainsi leur catabolisme. Les statines stimulent indirectement l'expression du gène du LDLR par des mécanismes de rétrocontrôles biomoléculaires.

Dans un premier temps, les statines, grâce à leur structure similaire à celle de l'HMG-CoA réductase, inhibent de façon compétitive et réversible l'activité de cette enzyme ¹¹⁰. Les principales molécules connues sont la lovastatine, la simvastatine, la pravastatine, la fluvastatine, la cérvastatine, l'atorvastatine et la rosuvastatine. L'HMG-CoA réductase est l'enzyme clé transformant l'HMG-CoA en mévalonate, le précurseur du cholestérol. Par conséquent, suite à l'inhibition de la synthèse de cholestérol, la concentration intracellulaire de cholestérol libre diminue, activant ainsi les mécanismes responsables de la surexpression du *LDLR* ¹¹¹.

En réponse à cette réduction de cholestérol intracellulaire, la cellule peut soit augmenter la synthèse endogène de cholestérol soit augmenter l'apport exogène de cholestérol *via* la capture des LDL (riches en cholestérol) par le LDLR. Vu que les statines bloquent la synthèse endogène par l'HMG-CoA réductase, la voie exogène est favorisée. L'expression du gène du LDLR est sous le contrôle du facteur de transcription SREBP-2 qui forme un complexe dans le réticulum endoplasmique avec la protéine SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) lorsque les concentrations de cholestérol sont faibles ¹¹². Ce complexe migre ensuite vers l'appareil de Golgi où SREBP-2 subit deux clivages successifs par S1P/SKI-1 et ensuite S2P libérant ainsi la partie N-terminale qui migre vers le noyau de la cellule. Ce fragment N-terminal de SREBP-2 s'associe avec les éléments de réponse aux stérols (SRE) présents dans le promoteur de certains gènes dont le *LDLR*. Cette association stimule la synthèse du récepteur, la capture des LDL, la clairance hépatique des LDL, réduisant ainsi le nombre de particules LDL dans le plasma et les concentrations de LDL-cholestérol. En plus du LDLR, SREBP-2 induit l'expression de plusieurs gènes associés au métabolisme du cholestérol dont l'HMG-CoA synthase, l'HMG-CoA réductase et la mévalonate kinase.

4.4.2. Fibrates

Les fibrates sont des acides carboxyliques amphipathiques utilisés comme agents hypolipidémisants. Contrairement aux statines, les fibrates sont plutôt impliqués dans le traitement des hypertriglycémies pures (types IV et V) et des hyperlipidémies mixtes (types IIb et III). Les fibrates comme le fénofibrate et le ciprofibrate diminuent le LDL-cholestérol et peuvent être employés, dans certains cas, chez des patients hypercholestérolémiques de type IIa¹⁰⁸. Les fibrates sont des agonistes des récepteurs-alpha activés de la prolifération des peroxyosomes (PPAR α , *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*) et agissent principalement sur l'hypertriglycémie en augmentant le catabolisme hépatique des acides gras, diminuant ainsi leur disponibilité pour la synthèse de VLDL. De plus, les fibrates induisent l'expression de la LPL et inhibent celle de l'apoCIII, l'inhibiteur naturel de la LPL, ce qui produit une augmentation marquée de l'hydrolyse des triglycérides des VLDL, et une diminution de la triglycémie¹¹³. La CETP permet des échanges de TG des VLDL vers les HDL en retour d'esters de cholestérol. Il existe également d'autres mécanismes où les triglycérides des VLDL s'échangent contre les esters de cholestérol des LDL. L'intensité de cet échange lipidique est d'autant plus importante que les concentrations de triglycérides des VLDL sont élevées. Par conséquent, plus les concentrations de triglycérides des VLDL sont élevées plus les LDL s'appauvrissent en esters de cholestérol et s'enrichissent en triglycérides. Ces LDL appauvries en esters de cholestérol et enrichies en triglycérides subissent l'action de la lipase hépatique et perdent des quantités importantes de triglycérides. Les pertes consécutives d'esters de cholestérol et de triglycérides provoquent la formation de LDL de petite taille. En diminuant la concentration des triglycérides des VLDL, les fibrates favorisent la formation de grosses LDL au détriment des petites. Les grosses LDL sont mieux reconnues par le LDLR que les petites LDL et donc éliminées plus rapidement du plasma par le foie, expliquant partiellement les réductions des concentrations de LDL-cholestérol observées avec les fibrates¹¹⁴.

4.4.3. Ezetimibe

L'ezetimibe est une molécule utilisée en clinique pour diminuer la concentration de cholestérol plasmatique. L'ezetimibe, qui est localisé à la bordure en brosse de l'épithélium intestinal, est un inhibiteur très sélectif de l'absorption du cholestérol intestinal. Plus spécifiquement, l'ezetimibe semble se lier à la protéine Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1), un transporteur impliqué dans l'absorption du cholestérol et situé sur la membrane des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal ¹¹⁵ et des hépatocytes ¹¹⁶. En plus de cet effet direct, une diminution de l'absorption de cholestérol mène à une expression plus élevée du LDLR sur la surface cellulaire et à une internalisation plus élevée des LDL, diminuant ainsi la concentration plasmatique de LDL-C.

Dans de nombreux modèles animaux, l'ezetimibe réduit l'absorption intestinale de cholestérol jusqu'à 96% et, par conséquent, réduit également les concentrations de cholestérol total et de LDL-C plasmatiques ^{117,118}. Chez l'humain, une étude a montré chez des patients ayant une hypercholestérolémie modérée une réduction de l'absorption intestinale de 54% et une augmentation de l'excrétion fécale de 72% du cholestérol alimentaire, résultant en une baisse du LDL-C de 22% ¹¹⁹. Cependant, cette inhibition de l'absorption de cholestérol était accompagnée d'une augmentation marquée de la synthèse hépatique de cholestérol, ce qui indique que la combinaison avec une statine pourrait être bénéfique.

4.4.4. Acide nicotinique

La niacine, aussi appelée vitamine B₃ et acide nicotinique, est un composé organique (C₅H₄HCO₂H) et fait partie des nutriments essentiels chez l'humain. La niacine est impliquée dans la réparation de l'ADN et la production d'hormones stéroïdiennes dans les glandes surrénales. La niacine, par un mécanisme dépendant de la lipase hormono-sensible (HSL), inhibe la mobilisation des acides gras du tissu adipeux, ce qui réduit la

disponibilité d'acides gras pour la synthèse de TG. Dans les hépatocytes, la niacine inhibe la synthèse d'acides gras et l'estérification du diacylglycérol (DAG) pour former les TG en inhibant directement l'action de l'acyltransférase du diacylglycérol (DGAT). Par conséquent, la diminution de synthèse de TG peut réduire la lipidation de l'apoB et sa translocation dans la membrane du réticulum endoplasmique, ce qui induit la dégradation de l'apoB. Ce mécanisme réduit le nombre de VLDL sécrétées et, par le fait même, le nombre de particules LDL, ce qui explique la réduction de la concentration plasmatique d'apoB et de LDL observée suite à un traitement par la niacine. De plus, l'inhibition de la synthèse de TG pourrait diminuer la concentration de grosses particules de VLDL riches en TG, et ainsi réduire la formation de LDL petites et denses, qui sont athérogènes ¹²⁰.

4.4.5. Résines

La seule voie d'élimination du cholestérol, en dehors de la desquamation cellulaire, est sa transformation en acides biliaires et son excrétion fécale. Les acides biliaires sont synthétisés à partir du cholestérol hépatique, grâce à l'enzyme clé, la 7 α -hydroxylase (CYP7A1), et entreposés dans la vésicule biliaire. Pendant la digestion, les acides biliaires sont sécrétés dans l'intestin, où ils solubilisent des lipides et les vitamines liposolubles pour faciliter leur absorption. La circulation entéro-hépatique permet la réabsorption d'environ 95% des acides biliaires et les réachemine au foie. Le 5% qui n'est pas réabsorbé est excrété dans les fèces, ce qui induit la synthèse *de novo* d'acides biliaires. Le quantité d'acides biliaires est constamment régulée par rétrocontrôle négatif et une interruption de la circulation entéro-hépatique affecte rapidement le métabolisme du cholestérol ¹²¹. L'interruption du cycle dévie la bile vers l'excrétion fécale et peut être réalisée par chirurgie ou par l'utilisation de séquestrants d'acides biliaires (résines). Ces séquestrants sont des résines insolubles et indigestibles chargées positivement qui se lient aux acides biliaires chargés négativement dans la lumière intestinale et qui sont ensuite excrétés. Ce mécanisme permet de diminuer la quantité d'acides biliaires d'environ 40% ¹²¹. Cette réduction d'acides biliaires active la synthèse de CYP7A1 et du LDLR hépatique, ce qui

augmente la synthèse d'acides biliaires et réduit par conséquent les concentrations de LDL-cholestérol. Parce que les résines réduisent l'absorption intestinale de cholestérol, moins de cholestérol entre dans la circulation, ce qui induit un mécanisme de compensation en augmentant la synthèse de cholestérol. Malgré cette synthèse, l'effet net est une réduction des concentrations de LDL-C *via* la synthèse de LDLR induite par le SREBP-2, due à la diminution de cholestérol intracellulaire. Cette surexpression de LDLR augmente la clairance des LDL, mais aussi celle des IDL, ce qui réduit la formation des LDL ¹²². Les résines réduisent généralement le LDL-C de 15 à 26% ¹²³. Les séquestrants d'acides biliaires conventionnels sont la cholestyramine et le colestipol. Le colesevelam HCL, une résine de nouvelle génération, possède une spécificité et une affinité accrues, augmentant sa capacité de liaison aux acides biliaires. Les résines ne sont pas absorbées par l'intestin, mais peuvent interférer avec l'absorption d'autres médicaments.

4.4.6. Phytostérols

Les phytostérols (stérols provenant des plantes) comme les stanols ont une structure très similaire à celle du cholestérol et sont aussi incorporés dans les micelles dans la lumière intestinale pour être absorbés. Parce que les stanols végétaux sont plus hydrophobes que le cholestérol, ils ont une plus grande affinité pour les micelles. Par conséquent, ils déplacent le cholestérol des micelles mixtes, résultant en une absorption réduite et une excrétion fécale accrue de cholestérol. Cependant, une incorporation réduite du cholestérol n'est pas le seul mécanisme de réduction de cholestérol par les phytostérols ¹²². Vu que les stanols réduisent l'absorption intestinale de cholestérol, le même mécanisme impliqué dans l'action des résines entre en jeu et induit la synthèse de LDLR et par conséquent une augmentation de la clairance des LDL. Une consommation quotidienne de 2 à 2,5g de phytostérols peut diminuer le LDL-C de 10 à 14%, sans effets secondaires apparents ¹²⁴. On peut retrouver les phytostérols dans les aliments enrichis en phytostérols, comme certaines margarines, mais aussi dans les huiles végétales, les légumineuses, les graines de tournesol et de sésames, les fruits, les légumes et les produits céréaliers.

4.4.7. Autres traitements en développement

Inhibiteur de l'acyl-cholestérol-acyltransférase (ACAT) : Avasimibe

L'ACAT catalyse la formation d'esters de cholestérol et régule l'apport de cholestérol dans les hépatocytes et les entérocytes *via* l'assemblage des lipoprotéines. Dans les modèles animaux, des inhibiteurs d'ACAT réduisent l'athérosclérose en diminuant l'absorption intestinale de cholestérol et les niveaux de cholestérol plasmatique et en inhibant la formation de cellules spumeuses dans la paroi artérielle ¹²⁵. Cependant, deux études par ultrasonographie intravasculaire chez l'humain, l'une utilisant l'avasimibe A-PLUS (*Avasimibe and Progression of Lesions on UltraSound*) et l'autre le pactimibe ACTIVATE (*ACAT Intravascular Atherosclerosis Treatment Evaluation*) n'ont pas montré d'effet bénéfique sur l'athérosclérose des coronaires; les deux inhibiteurs d'ACAT ont réduit les TG, mais l'avasimibe a aussi augmenté le LDL-cholestérol significativement ^{126,127}.

Inhibiteur de la protéine de transfert microsomial (MTP) : Implitapide et AEGR-733

La MTP joue un rôle important dans l'assemblage des lipoprotéines contenant l'apoB, notamment les VLDL du foie et les chylomicrons de l'intestin. En bloquant cette enzyme, il serait donc possible de réduire l'absorption intestinale de lipides et de réduire la production hépatique de VLDL, et par conséquent, de LDL. De hautes doses d'inhibiteurs de la MTP peuvent provoquer une baisse de 58% de la concentration de cholestérol total, de 51% du LDL-C et de 55% de l'apoB plasmatique ¹²⁸, entraînant également une stéatose hépatique due à une accumulation de TG résultant de l'inhibition de leur sécrétion *via* les VLDL. Quelques patients ont également présenté une concentration de transaminase élevée, des nausées et d'autres troubles gastro-intestinaux. On a émis l'hypothèse que la stéatose hépatique pourrait être reliée à la dose d'inhibiteur de MTP. Des essais cliniques

sont en cours avec des doses réduites d'implitapide et d'AEGR-733 pour déterminer une fenêtre thérapeutique qui pourrait réduire le LDL-C, sans affecter la fonction hépatique.

De récentes études de phase 2 avec l'AEGR-733 ont démontré une efficacité en monothérapie sur 12 semaines. L'AEGR-733 peut réduire le LDL-C de façon dose-dépendant jusqu'à 30% en monothérapie et jusqu'à 46% en combinaison avec l'ezetimibe ($p < 0,001$; $n=84$)¹²⁹. Par contre, une légère baisse des HDL (-7%; $p=0,017$) a été observée et 6 des 28 patients avec AEGR-733 en monothérapie ont dû arrêter le traitement à cause d'une concentration élevée de transaminase. L'AEGR-733 est principalement développé pour les patients qui ne peuvent atteindre leur cible thérapeutique ou qui sont intolérants aux statines¹³⁰.

Inhibiteur de la squalène synthase

La squalène synthase est l'enzyme qui convertit le farnesyl pyrophosphate en squalène dans la voie de synthèse du cholestérol. Vu que les inhibiteurs de la squalène synthase inhibent la synthèse de cholestérol à une étape suivant la synthèse de mévalonate et des métabolites isoprénylés, ces agents pourraient avoir des effets hypolipémiants sans myotoxicité ni hépatotoxicité observées quelques fois avec les statines¹³¹. Le traitement de quatre mammifères différents (le rat, le chien, le singe *Cynomolgus* et le ouistiti) avec la molécule TAK-475, maintenant nommée lapaquistat, diminue la synthèse hépatique de cholestérol et les concentrations plasmatiques de VLDL et de TG sans modifier les concentrations de HDL. Dans les cellules HepG2, TAK-475 augmente la liaison de ¹²⁵I-LDL aux LDLR¹³². Ces résultats suggèrent que le lapaquistat a un effet hypolipémiant chez l'animal *via* l'inhibition de la sécrétion des triglycérides hépatiques et *via* l'augmentation de l'expression de LDLR.

Le lapaquistat a été évalué chez l'humain lors d'une importante étude de phase 3 durant les trois dernières années. À des doses de 25 mg/jour et de 50 mg/jour, le LDL-C

diminue de 20% et 25%, respectivement, et la diminution s'additionne à celle produite par un traitement avec l'atorvastatine. Par contre, des taux élevés de transaminase ont été notés. Après deux cas sévères de transaminase élevée, la compagnie Takeda a décidé de mettre fin aux études de développement de ce produit. Malheureusement, après l'échec du lapaquistat et d'autres inhibiteurs de la squalène synthase à démontrer un profil sécuritaire dans les études cliniques, la squalène synthase ne sera, à l'avenir, plus reconnue comme une cible thérapeutique¹³⁰.

Oligonucléotides anti-sens : ApoB-100 (Mipomersen)

Les oligonucléotides anti-sens (ASO) sont de l'ADN simple brin qui correspond à une séquence spécifique d'ARNm. Les ASO s'hybrident à l'ARNm ciblé, induisant la dégradation sélective de cet ARNm. Les ASO donnés en injection sous-cutanée ont une longue demi-vie et se dirigent principalement vers le foie et le rein pour leur catabolisme.

Dans des études de phase 2, des réductions de 30% à 50% du LDL-C et de Lp(a) ont été obtenues avec l'ASO de seconde génération contre l'apoB (Mipomersen). Mais il y aurait des limites quant à la dose administrée à cause d'une élévation de la transaminase et de réactions au site d'injection¹³³. Des études à long terme sont requises pour l'approbation de ce traitement par la FDA (*US Food and Drug Administration*).

Inhibiteur de PCSK9

Pendant les sept dernières années, plusieurs études ont suggéré que le LDLR hépatique pouvait être régulé au niveau post-translationnel par la proprotéine convertase PCSK9 aussi appelée NARC-1. Des analyses génétiques ont démontré que des mutations de « gain de fonction de *PCSK9* » causaient une hypercholestérolémie autosome dominante caractérisée par une élévation du LDL-C, tandis que des mutations de « perte de fonction »

réduisaient le LDL-C de 40%^{6,106}. De plus, des études chez la souris ont montré qu'une surexpression de PCSK9 provoquait une réduction du LDLR hépatique associée à une hypercholestérolémie, tandis qu'une déficience en PCSK9 induisait une diminution de 50% du cholestérol total et une augmentation de trois fois de l'expression hépatique du LDLR^{49,52,53}. Ces études suggèrent donc que PCSK9 agirait normalement pour réduire l'expression du LDLR dans le foie et qu'une inhibition pharmacologique de PCSK9 permettrait d'augmenter le LDLR et la clairance plasmatique du LDL-C. Cette hypothèse est renforcée par la démonstration qu'une souris déficiente en PCSK9 est hypersensible aux statines, suggérant qu'un inhibiteur de PCSK9 pourrait agir de façon synergique avec les statines⁵³. Récemment, l'effet de l'inhibition de l'expression de PCSK9 (par l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens et l'interférence ARN)^{54,134} ou de son activité (injection d'un anticorps monoclonal contre PCSK9)¹³⁵ sur le LDLR ont été testés dans des modèles animaux, incluant la souris et le singe, mais rien n'a été vérifié chez l'humain à ce jour.

Une revue des différentes approches thérapeutiques résume bien les avancées jusqu'à ce jour¹³⁶. Les premiers résultats, obtenus par la compagnie *Isis Pharmaceuticals, Inc.*, ont montré que l'utilisation d'un ASO hydrosoluble de 20 nucléotides en injection sous-cutanée chez des souris ayant une diète riche en gras pendant six semaines provoquait une réduction d'environ 90% de l'ARNm hépatique de *PCSK9*. De plus, le cholestérol total circulant ainsi que le LDL-C ont été réduits de 53% et 38%, respectivement, et le niveau hépatique de LDLR a été augmenté de deux fois⁵⁴. Cette étude a fourni la première confirmation que les ASOs injectables pourraient être une approche thérapeutique très utile pour réduire l'expression hépatique de PCSK9, pouvant même être utilisée en combinaison avec une statine.

La seconde approche consiste en l'utilisation de petits ARN interférents encapsulés dans un liposome sous forme de nanoparticules lipidoïdes injectables (LNP; *Alnylam Pharmaceuticals*)¹³⁴. Suite à l'administration intraveineuse d'une dose de charge, les effets d'extinction génique (*gene silencing*) ont duré trois semaines et ont mené à une réduction

de 50 à 70% de l'ARNm de PCSK9 hépatique chez la souris et le rat, et à une réduction significative du LDL-C chez les singes cynomolgus, sans affecter le HDL-C ou les TG ¹³⁴. Ces résultats semblent très prometteurs, mais il reste à déterminer si l'injection de ces LNP a des effets toxiques chez l'humain et si leur coût de production est raisonnable pour une utilisation de routine dans les hôpitaux et les cliniques ¹³⁶.

La troisième approche suggère l'utilisation d'ASOs solubles composés de 8 à 11 nucléotides selon la technologie « *Locked Nucleic Acid (LNA)* » de la compagnie Santaris Pharma, une technologie qui a démontré son innocuité et sa fiabilité chez la souris et le primate non-humain. Une injection de LNA deux fois par semaine produit un effet neutralisant qui peut durer jusqu'à 21 jours ^{137,138}. Cette approche présente l'avantage de l'utilisation de petits ARN chimériques solubles qui ont une grande affinité de liaison à l'ARN ciblé, se traduisant donc en de puissants inhibiteurs d'ARNm. Il reste à déterminer si cette approche est applicable chez l'humain ¹³⁶. Des résultats très récents tendent à démontrer que cette approche pourrait en effet être très efficace chez la souris, et possiblement chez le singe ¹³⁹.

4.5. Mutations « gain-de-fonction » de PCSK9 et hypercholestérolémie

4.5.1. Mécanisme

Plusieurs études effectuées chez la souris et dans des lignées cellulaires humaines ont montré que *PCSK9* était régulé comme un gène cholestérogénique; la transcription de *PCSK9* est augmentée par SREBP-2 et diminuée par le cholestérol^{41,55,56}. Par la suite, il a été démontré qu'une surexpression de *PCSK9* induisait une dégradation accélérée du LDLR et, par conséquent, une augmentation du LDL-C plasmatique due à une diminution de l'internalisation du LDL par les hépatocytes^{41,51,52,140}. Parallèlement, l'inactivation de *Pcsk9* chez la souris augmentait le LDLR hépatique et diminuait le LDL-C plasmatique^{49,53}. Suite à ces études, le mécanisme exact de l'action de *PCSK9* sur le LDLR commence à être élucidé, et une schématisation simplifiée de ce mécanisme est illustrée à la figure 13. Premièrement, *PCSK9* (en bleu) subit un clivage autocatalytique dans le RE. Le pro-domaine clivé s'associe à la partie catalytique de *PCSK9* et agit comme une protéine chaperon pour permettre la sortie dans la voie sécrétoire. *PCSK9* pourrait agir à deux sites possibles : dans un compartiment post-RE et sur la surface cellulaire. En effet, *PCSK9* pourrait se lier au LDLR dans la voie sécrétoire et le diriger vers un compartiment acide, comme le lysosome, pour la dégradation^{93,141}. Par ailleurs, il a également été démontré que *PCSK9* pouvait agir de l'extérieur de la cellule pour détruire le LDLR, *in vitro* en ajoutant *PCSK9* au milieu de culture⁹¹ et *in vivo* dans les souris parabiotiques⁷⁷. L'effet net de *PCSK9* est donc une diminution de la quantité de récepteurs à la surface cellulaire résultant en une captation réduite des LDL plasmatiques.

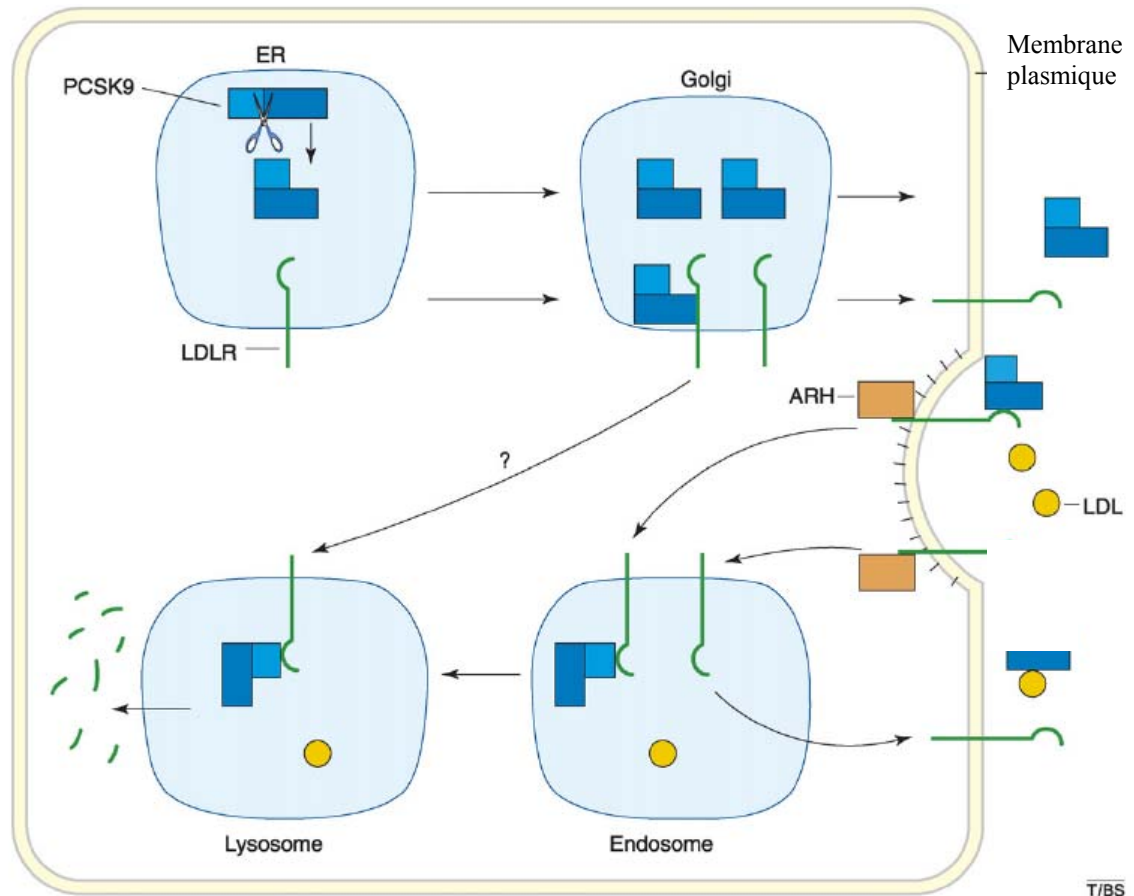


Figure 13. Voie cellulaire et sites d'action de PCSK9. La PCSK9 subit un clivage autocatalytique dans le RE. Le prodomaine ainsi clivé (bleu pâle) s'associe au fragment catalytique (bleu foncé) and agit comme une protéine chaperon permettant la sortie du complexe dans la voie sécrétoire. La PCSK9 pourrait agir à deux sites potentiels. Dans un compartiment post-RE (le Golgi dans cette figure), la PCSK9 pourrait se lier au LDLR (en vert) et induire sa dégradation en migrant vers un compartiment acide comme le lysosome. D'autre part, la PCSK9 sécrétée pourrait se lier au LDLR sur la surface cellulaire. Le complexe PCSK9-LDLR est alors internalisé à l'aide de la protéine adaptatrice ARH (en orange). La PCSK9 pourrait entraver le recyclage du LDLR de l'endosome vers la surface cellulaire et/ou promouvoir directement sa dégradation au lysosome. Traduit de Horton & Cohen, Trends Biochem Sci, 2007 ¹⁴².

Différentes études ont permis d'élucider l'effet de certaines mutations sur la synthèse et la sécrétion de PCSK9 pour expliquer le phénotype observé chez les patients.

Les premières mutations identifiées causant une hypercholestérolémie ont été appelées mutations « gain de fonction », car l'action de PCSK9 sur le LDLR semblait augmentée. Les mutations ont donc été classées en différentes catégories, similaires aux classes de mutations du LDLR. Alors, comme chez l'HF HTZ, le type de mutation de la protéine en question peut influencer la sévérité du phénotype. Il a été démontré *in vitro*, que la mutation D374Y de PCSK9 conférait une capacité 10 fois plus grande de destruction du LDLR⁷⁷, ce qui pourrait expliquer le phénotype sévère de cette mutation chez les patients.

Tableau 4. Défauts fonctionnels associés à une mutation naturelle « gain de fonction » ou « perte de fonction » de PCSK9 chez l'humain. Adapté de Horton *et al.* Trends Biochem Sci 2007¹⁴².

Mutation	Classe de mutation et défaut fonctionnel				
	Classe 1 Nul	Classe 2 ↓maturation	Classe 3 ↓transport du RE	Classe 4 ↓Stabilité	Classe 5 ↓/↑ Affinité vs LDLR
« Gain de fonction »					
S127R	-	X	X	?	?
F216L	-	-	-	?	?
D374Y	-	-	-	?	X
« Perte de fonction »					
R46L	-	-	-	?	?
Δ97R	-	X	X	-	-
G106R	-	X	X	-	-
Y142X	X	-	-	-	-
L253F	-	X	X	-	-
A443T	-	-	-	?	?
C679X	-	-	X	-	-

4.5.2. Présentation clinique

Les patients présentant une mutation de PCSK9 ont un phénotype clinique qui ressemble grandement à celui causé par l'hypercholestérolémie familiale HTZ. Le tableau 5 résume les principales caractéristiques de ces patients. Il est donc possible de remarquer que le niveau de LDL-C est très élevé et qu'une grande partie de ces patients présente des xanthomes et une histoire de maladie coronarienne, caractéristiques associées à l'HF HTZ. Il est également important de noter que la mutation D374Y de *PCSK9* semble provoquer un phénotype beaucoup plus sévère que les autres mutations, surtout chez les familles identifiées en Angleterre¹⁴³. Naoumova *et al.*¹⁴³ ont comparé les caractéristiques cliniques de patients ayant des mutations du LDLR et de PCSK9 (Tableau 6) et ont noté qu'en plus de la concentration de cholestérol plasmatique plus élevée, les patients porteurs de la mutation D374Y de PCSK9 développaient une maladie coronarienne 10 ans plus tôt que les patients avec une HF HTZ.

Donc, si l'on compare les données du tableau 5 avec les données relatives aux mutations du LDLR du tableau 6, nous pouvons conclure que le phénotype des deux causes de HF sont pratiquement les mêmes. Cependant, la mutation Anglo-Saxonne D374Y, où les concentrations plasmatiques de cholestérol total, de triglycérides et de LDL-C sont significativement plus élevées que dans une HF HTZ, semble présenter un phénotype plus sévère, comparable à celui d'une HF homozygote.

Effet additif de mutations du *LDLR* et de *PCSK9*

Un groupe de chercheurs italiens a montré un effet additif des mutations du *LDLR* et de *PCSK9* sur le phénotype des patients¹⁴⁴. En effet, deux patients non apparentés montraient un phénotype clinique et une histoire familiale suggérant un diagnostic d'HF HMZ. Leur taux plasmatique de LDL-C (13,39 et 11,51 mmol/L) était supérieur à celui de 770 patients HF HTZ (7,34 mmol/L), mais inférieur à celui de 42 patients HF HMZ (17,32

mmol/L). Les deux propositi étaient chacun porteurs de deux mutations non-synonymes, une dans le LDLR (E228K), reconnue comme étant sévère, et une autre dans PCSK9 (R496W et N425S, respectivement). Ces résultats montrent donc que ce phénotype ressemblant à celui d'un homozygote pour le *LDLR* était en fait dû à l'effet combiné des gènes *LDLR* et *PCSK9*.

Tableau 5. Caractéristiques cliniques des patients présentant une mutation « gain de fonction » de *PCSK9*.

Mutation	Famille (nb.pers.affectées)	CT	LDL- C	HDL- C	TG	Phénotype	Références	
S127R	HC92 (12)	9,42	7,45			xanthomes tendineux, maladie coronarienne, infarctus du myocarde (IM) précoce, accident cérébrovasculaire	6	
S127R	HC2 (7)	9,55	7,96	1,23	1,05	Arc cornéen, xanthomes tendineux, xanthélasmas	42	
F216L	HC60 (3)	7,76	5,90			IM à 49 ans (propositus)	6	
D374Y	K1173 (32)	9,00	6,80	0,97	3,05	xanthomes tendineux	43,145,146	
D374Y	34(3), 305(1)	75(3),	10,91	9,05	1,11	1,12	xanthomes tendineux	147
R218S	HC119 (4)	8,53	6,05	1,66	0,80	xanthomes tendineux, arc cornéen	148	
R469W	FH489	10,80	9,27	1,30	0,49	xanthomes tendineux	148	
R496W	ZP I-1 ZP II-1*	>15,00*	5,58 13,39*			Athérosclérose IM à 31 ans*, xanthomes*, xanthélasmas*	144	
D374Y	4 familles (13)	13,60	11,30	1,20	1,70	xanthomes tendineux, arc cornéen, xanthelasma, angine	143	

* en combinaison avec une mutation du LDLR (E228K)

Les valeurs de références pour un phénotype « normal » sont les suivantes : Cholestérol total (CT) < 5,17 mmol/L, cholestérol des LDL (LDL-C) < 2,59 mmol/L, cholestérol des HDL > 1,04 mmol/L et triglycérides (TG) < 1,70 mmol/L ¹⁴⁹.

Tableau 6. Caractéristiques cliniques des patients portant une mutation des gènes du LDLR et de PCSK9. Données lipidiques pré-traitement, moyenne (écart-type). Adapté de Naoumova *et al.* ATVB 2005 ¹⁴³

Mutation	N	H/F	Âge à la présentation	Xanthomes tendineux (n)	Patients avec MCV (âge moyen)	Cholestérol total (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol-L)	LDL-C (mmol/L)	Ratio CT/HDL-C
<i>PCSK9</i> D374Y	13	5/8	20,8 (14,7)†	8	6 (35,3)†	13,6 (2,9)‡	1,7 (0,5)§	1,2 (0,4)	11,3 (4,1)‡	11,8 (6,2)
<i>LDLR</i> Exon 4	14	7/7	26,3 (15,3)	6	5	9,1 (1,8)	0,8 (0,3)	1,14 (0,16)	7,0 (1,5)	7,6 (2,3)
<i>LDLR</i> Intron 3	8	5/3	35,5 (18,4)	6	5	10,6 (1,7)	1,3 (0,5)	1,20 (0,20)	8,3 (1,0)	8,3 (1,4)
<i>LDLR</i> nul	14	7/7	31,1 (14,7)	6	3	9,6 (1,2)	1,2 (0,67)	1,30 (0,36)	8,0 (1,37)	8,1 (2,4)
Toutes mutations <i>LDLR</i>	36	19/1 7	30,2 (15,7)	18	19 (46,8)	9,6 (1,6)	1,1 (0,6)	1,2 (0,27)	7,7 (1,4)	8,0 (2,0)

Comparaisons entre les groupes *PCSK9* D374Y et toutes les mutations *LDLR* : † p=0,003; ‡ p=0,004; § p=0,002.

4.6. Mutations « perte-de-fonction » de PCSK9 et hypocholestérolémie

4.6.1. Mécanisme

Suite à la découverte du gène *PCSK9* et de mutations causant une hypercholestérolémie, le groupe de Cohen *et al.*¹⁰⁶ a cherché des mutations de *PCSK9* chez des sujets ayant une concentration plasmatique très basse de LDL-C (< 1,50 mmol/L) dans la cohorte Dallas Heart Study (DHS; n=3543) du Texas. Ce groupe a donc identifié deux mutations non-sens, qui codent pour un codon stop et un arrêt de la synthèse de la protéine. La mutation Y142X dans l'exon 3 de *PCSK9* a été retrouvée chez 0,4% des Afro-Américains et cause une instabilité et la dégradation de l'ARNm et donc une absence de la synthèse et de la sécrétion de PCSK9. La mutation C679X a été retrouvée chez 1,4% des Afro-Américains, mais très rarement chez les Américains d'origine européenne (< 0,1%). Cette mutation de l'exon 12 ne retranche que les 14 derniers acides aminés de la protéine, mais provoque un changement de conformation qui empêche la sortie de PCSK9 du RE⁷¹. Le mécanisme par lequel les mutations « perte de fonction » du gène *PCSK9* réduisent la concentration de cholestérol plasmatique a été investigué à l'aide de la souris déficiente en *Pcsk9*. Ces animaux ont une expression hépatique plus élevée du LDLR, une clairance accélérée des LDL et une concentration réduite de cholestérol plasmatique^{49,53}. Donc, PCSK9, en réduisant le nombre de LDLR, limite la capture des lipoprotéines par le foie. Par conséquent, une mutation affectant l'action de PCSK9 sur le LDLR (perte de fonction) provoque une augmentation du nombre de LDLR et une diminution de la concentration plasmatique de LDL-C.

4.6.2. Présentation clinique

Les individus portant une mutation non-sens, soit un Afro-Américain sur 50, ont une concentration de LDL-C significativement plus basse d'environ 28%, mais ne sont pas

tous hypocholestérolémiques ⁵⁰. La mutation C679X a aussi été retrouvée dans une population du Nigéria avec la même fréquence ¹⁵⁰ et chez les femmes africaines du Zimbabwe avec une fréquence de 3,7% et une réduction de 27% du LDL-C ¹⁵¹.

Beaucoup de variations génétiques de PCSK9 ont été observées et ont des effets très variables, souvent pour un même polymorphisme chez différents individus (Figure 5). Dans le but d'identifier de nouvelles variantes de PCSK9, le groupe de Helen Hobbs ¹⁵⁰ a séquencé le gène *PCSK9* des individus de la cohorte DHS ayant une basse (< 5^e percentile) et une haute concentration (> 95^e percentile) de LDL-C. Trois polymorphismes associés à une basse concentration de LDL-C (-5% à -30%) ont ainsi été découverts : L253F et A443T chez les Noirs et R46L chez les Blancs ¹⁵⁰. Les variantes R46L et A443T sont associées à un taux plus bas de LDL-C dans certaines études de population ^{150,152-154}, mais ils peuvent également se retrouver chez des individus normo- et hypercholestérolémiques à cause de l'influence de plusieurs facteurs génétiques et environnementaux ^{6,148,150} (Figure 5).

Jusqu'à maintenant, plusieurs mutations de PCSK9 reliées à une basse concentration de LDL-C ont été identifiées. Elles comprennent entre autres : G106R ¹⁵², T771I, V114A, A522T, P616L ¹⁵³, Q219E, A239D, G452D, S668R et R93C ¹⁵⁵. Finalement, deux mutations non-sens, A68fsL82X (un changement de cadre de lecture au codon 68 qui cause un codon stop à la position 82) et W428X, ont été rapportées chez des patients hypocholestérolémiques d'origine sicilienne et japonaise, respectivement ^{153,155}. Tous ces polymorphismes ont des fréquences variables dans différentes populations selon l'ethnie. La plupart des mutations citées plus haut sont associées à des concentrations significativement plus basses de LDL-C, mais seulement quelques unes causent une véritable hypocholestérolémie. Le tableau 7 présente ces mutations ainsi que leurs principales caractéristiques. Il est important de noter que certains patients présentent une hypobétalipoprotéïnémie ainsi qu'une diminution importante du risque de maladie coronarienne, tel que discuté dans les prochaines sections.

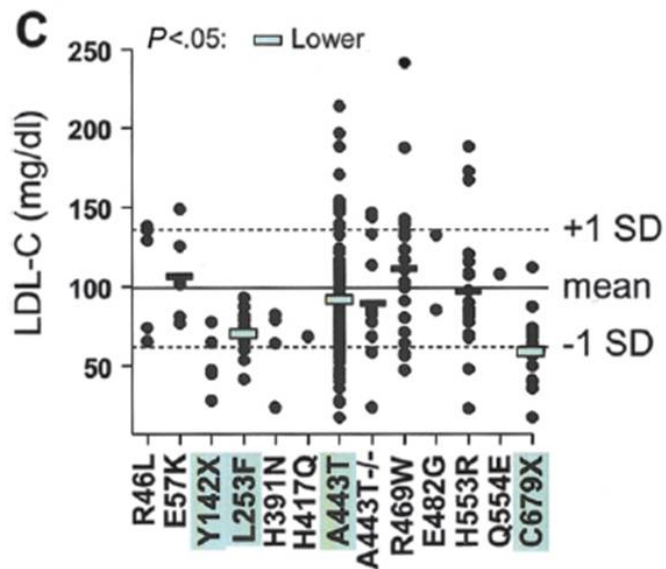
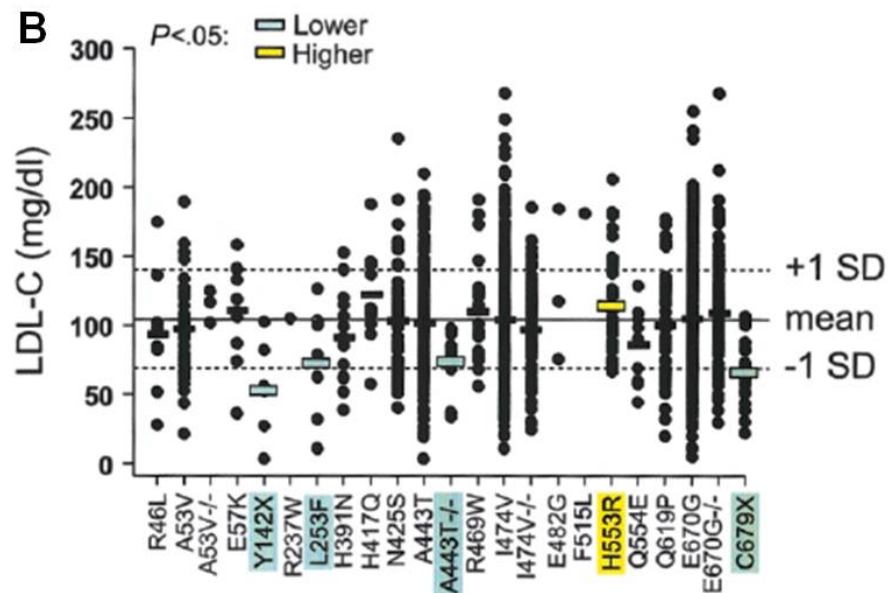
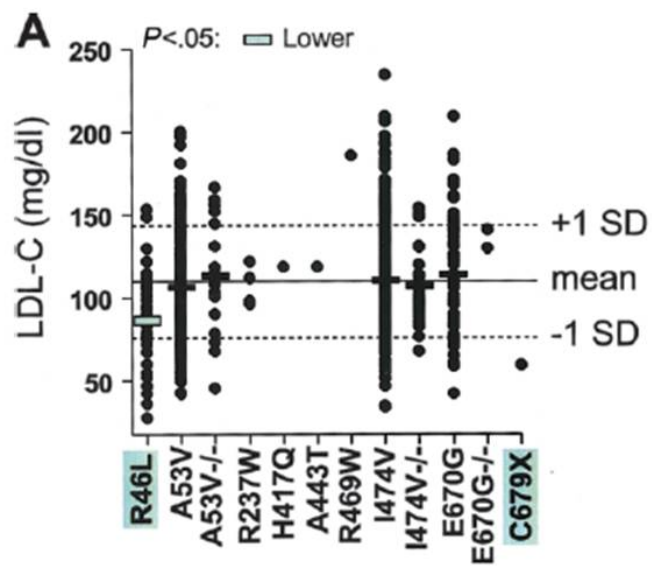


Figure 14. Niveaux de LDL-C plasmatique chez les Blancs de la cohorte DHS (A), les Noirs de la cohorte DHS (B) et les Noirs de la cohorte Cook County (C). La moyenne (mean) et l'écart-type (SD) ajustés pour l'âge et le sexe sont montrés. Barres horizontales, Moyenne du LDL-C plasmatique pour chaque variant (omis si $n < 6$). Les niveaux de LDL-C significativement plus bas (lower) ou plus haut (higher) sont indiqués par un ombrage vert ou jaune, respectivement.

Adapté de Kotowski *et al.* Am J Hum Genet 2006.

Tableau 7. Caractéristiques cliniques des mutations causant une hypocholestérolémie. Adapté d'Abifadel *et al.* Hum Mutat 2009⁵⁰.

Nucléotide muté	Acide aminé muté	Exon	Origine	Cholestérol total moyen (mmol/L)	LDL-C moyen (mmol/L)	Caractéristiques cliniques	Test <i>in vitro</i> de la mutation	Réf.
c.202delG	p.A68fsL82X	1	Sicile, Italie	P : 3,80 D : 2,15 et 2,53	P : 2,25 D : 0,62 et 0,96	P et son père : stéatose hépatique	N/D	153
c.316G>A	p.G106R	1	Norvège	4,63±0,83	2,35±0,23	-	↓ Auto-activation et transport de PCSK9, ↑ LDLR	91,93,15 2
c.426C>G	p.Y142X	3	Afro-américains	4,58±0,11	2,66±0,10	↓ LDL-C et de la MCV	ARNm instable et dégradé	150,156
c.1284G>A	p.W428X	8	Japon	N/D	0,75 à 2,28	N/D	N/D	155
c.2037C>A	p.C679X	12	Américains (Noirs et Blancs)	4,45±0,12	2,59±0,12	↓ LDL-C et de la MCV	Rétention de PCSK9 dans le RE	150,156

Abréviations : P, *propositus*; D, *donneurs de sang*; N/D, non disponible

4.6.3. Hypobêtalipoprotéinémie

L'hypobêtalipoprotéinémie primaire (HBL) réfère à un groupe de désordres génétiques caractérisés par un niveau très bas (<5^e percentile de la distribution de la population) de LDL-cholestérol et d'apoB ¹⁵⁷. L'HBL peut être associée ou non à des caractéristiques cliniques telles qu'une stéatose hépatique, une malabsorption intestinale des lipides et une dysfonction neurologique et oculaire. Trois désordres génétiques sont inclus dans le groupe HBL : (1) l'hypobêtalipoprotéinémie familiale (FHBL), généralement causée par une mutation du gène *APOB*; (2) l'abêtalipoprotéinémie (ABL), causée par une mutation de gène *MTTP*; (3) la maladie de rétention des chylomicrons, causée par une mutation du gène *SARA2* ¹⁵⁷. *SARA2* encode la protéine Sar1b qui est impliquée dans le transport intracellulaire des chylomicrons et son inactivation cause, par conséquent, une rétention des chylomicrons dans les entérocytes et une malabsorption sévère de lipides et de vitamines liposolubles.

Des études récentes démontrent que *PCSK9* serait un important gène impliqué dans l'hypobêtalipoprotéinémie. En effet, des mutations de *PCSK9* à l'état homozygote ou hétérozygote composite peuvent causer une hypocholestérolémie sévère. Le cas d'une femme originaire du Zimbabwe, homozygote pour C679X a été rapporté par Hooper *et al.*¹⁵¹. Elle présentait une concentration plasmatique de LDL-C de 0,4 mmol/L comparativement à 2,2 mmol/L chez les sujets contrôles de l'étude. De plus, une Africaine-Américaine de 32 ans, hétérozygote composite (Y142X et Δ97), en apparente bonne santé, présentait une concentration plasmatique de LDL-C de 0,36 mmol/L et une concentration plasmatique de PCSK9 indétectable ⁷⁸. Par ailleurs, l'étude de sujets FHBL sans mutation de l'*APOB* a démontré la présence de la mutation A68fsL82X ¹⁵³. La concentration plasmatique de LDL-C du propositus était de 1,37 mmol/L et il présentait une stéatose hépatique. La mutation a également été observée chez deux donneurs de sang, en bonne santé et non-apparentés, et présentant des concentrations plasmatiques de LDL-C de 0,62 et 0,96 mmol/L. Finalement, une étude récente avec des patients FHBL a démontré la présence d'une double mutation monoallélique de *PCSK9* (R104C/V114A) qui coségrégait avec le phénotype FBHL ¹⁵⁸. La vitesse de clairance des LDL chez ces patients était significativement augmentée. L'analyse *in vitro* de cette double mutation a montré une

maturation et une sécrétion sévèrement altérées ainsi qu'un effet dominant négatif sur la sécrétion de la PCSK9 native.

4.7. Impact de PCSK9 sur la maladie cardio-vasculaire

Après la découverte de trois mutations « perte de fonction » relativement fréquentes dans la cohorte DHS, Y142X et C679X chez les Afro-Américains et R46L chez les Caucasiens ¹⁰⁶, une importante question concernant la relation entre le LDL-C et la maladie cardio-vasculaire (MCV) se posait : est-ce qu'une basse concentration plasmatique de LDL-C tout au long de la vie confère une plus grande protection contre la MCV qu'une thérapie hypocholestérolémiante débutée plus tard chez un patient ayant un LDL-C élevé? Vaut-il mieux traiter très tôt un patient ayant une concentration de LDL-C située dans la normale supérieure? Dans la vaste étude prospective « Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) », la comparaison de l'incidence de MCV sur un intervalle de 15 ans, selon la présence ou non de ces 3 variantes, a été établie chez 3363 Afro-Américains et 9523 Caucasiens âgés de 45 à 64 ans ¹⁵⁶. Dans cette étude, les mutations non-sens avaient une fréquence de 2,6% chez les Afro-Américains et la mutation R46L une fréquence de 3,2% chez les Caucasiens. Les mutations non-sens Y142X et C679X causant une réduction du LDL-C de 28% ont diminué la fréquence de MCV (définie comme infarctus du myocarde, mort par infarctus ou revascularisation coronaire) de 88%. Dans la même étude, les Caucasiens avec un allèle R46L avaient une réduction de 50% de l'incidence de MCV, malgré une réduction moyenne de la concentration plasmatique de LDL-C de seulement 15%. Ces allèles de PCSK9 étaient également associés à un risque réduit d'athérosclérose des carotides avec une épaisseur intima-media moyenne légèrement mais significativement inférieure chez les porteurs de la mutation comparativement aux non-porteurs, et ce, dans les deux groupes (Noirs et Blancs) ¹⁵⁶. Ces réductions de MCV associées à ces mutations sont plus importantes que celles observées lors d'essais cliniques employant des statines, qui se déroulent typiquement sur 5 ans ¹⁵⁹. Ces données suggèrent qu'une intervention médicamenteuse plus précoce, visant à diminuer la concentrations plasmatique de

cholestérol chez des patients hypercholestérolémiques, pourrait amplifier l'efficacité clinique des traitements à atténuer le développement et la progression de l'athérosclérose ¹⁴².

Un haplotype commun comprenant E670G a été identifié comme un déterminant indépendant de la concentration plasmatique de LDL-C et de la sévérité de l'athérosclérose coronarienne dans l'étude « *Lipoprotein Coronary Atherosclerosis Study (LCAS)* » (n=372, LDL-C entre 2,97 et 4,91 mmol/L) et dans la population TexGen de Houston (Texas) (n=319, LDL-C < 3,36 mmol/L) ¹⁶⁰. Le polymorphisme E670G était responsable de 3,5% de la variabilité du LDL-C, avec une concentration plus élevée pour le génotype GG, une concentration intermédiaire pour le génotype AG et une concentration plus basse pour le génotype AA. La concentration de cholestérol plasmatique total, de l'apoB ainsi que de la lipoprotéine (a) (Lp(a)) étaient également associés au polymorphisme E670G dans ces populations ¹⁶⁰. Une troisième étude, chez 506 européens, a confirmé une association entre le polymorphisme E670G de PCSK9 et une concentration plasmatique élevée de LDL-C ¹⁶¹. De plus, une étude qui avait pour but de déterminer un lien potentiel entre les mutations de PCSK9 et le risque d'accident cérébro-vasculaire ou avec le développement d'athérosclérose intracrânienne a démontré que le polymorphisme E670G était associé au risque d'athérosclérose des gros vaisseaux intracrâniens dans une population belge ¹⁶². Enfin, dans une étude finlandaise comprenant 604 Caucasiens morts subitement en dehors de l'hôpital, le polymorphisme E670G tendait à être associé à une athérosclérose plus importante dans les grandes artères intracérébrales (P=0,095) ¹⁶².

Finalement, il est intéressant de noter qu'il existe un site qui répertorie toutes les mutations et polymorphismes du gène *PCSK9* dans une banque de données continuellement mise à jour, située sur le même site que la banque des mutations du *LDLR* (http://www.ucl.ac.uk/ldlr/Current/index.php?select_db=PCSK9) ¹⁶³.

5. Concentrations plasmatiques de PCSK9 chez l'humain

Comme nous l'avons expliqué, PCSK9 module les concentrations plasmatiques de LDL-C en favorisant la dégradation du LDLR, la principale voie d'élimination de la circulation des LDL. PCSK9 semble bloquer le recyclage du LDLR et le rediriger vers le lysosome pour dégradation, provoquant ainsi une réduction de la clairance des LDL et une accumulation de LDL-C dans la circulation ¹⁴². Plusieurs études ont démontré que PCSK9 se liait au LDLR sur la surface cellulaire. Notamment, l'addition de PCSK9 recombinante au milieu de culture d'hépatocytes réduit le nombre de LDLR sur la surface cellulaire, et des expériences de parabiose (chirurgie expérimentale pour lier deux organismes par leurs vaisseaux sanguins) chez la souris ont démontré que la PCSK9 circulante pouvait promouvoir la dégradation du LDLR hépatique ^{77,92}. Même si PCSK9 est exprimé dans plusieurs tissus, des expériences chez des souris déficientes en PCSK9 dans le foie seulement suggèrent que la majorité de la PCSK9 circulante provient de cet organe ⁴⁹. Tous ces éléments nous amènent à croire que la PCSK9 joue un rôle important à partir de la circulation sanguine. Plusieurs groupes, dont le nôtre, ont donc développé des techniques de mesure de la PCSK9 plasmatique.

5.1. Détection

La principale technique de détection utilisée par les différents groupes qui ont mesuré la PCSK9 plasmatique était le test ELISA. ELISA est l'acronyme d'un test de laboratoire appelé « *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* », littéralement « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée », c'est-à-dire dosage immunoenzymatique sur support solide. L'ELISA est une technique biochimique utilisée afin de détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. La technique utilise un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique à l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire, grâce à la réaction de l'enzyme avec un substrat chromogène ou fluorogène, peut causer l'émission d'un signal quantifiable. L'ELISA pouvant être utilisé tant pour évaluer la présence d'un antigène que celle d'un anticorps dans un échantillon, c'est un

outil efficace à la fois pour déterminer des concentrations sériques d'anticorps (comme pour le test HIV ou le virus du Nil), que pour détecter la présence d'un antigène. C'est un test simple, facile d'emploi et peu coûteux. Il est limité par la disponibilité en anticorps spécifique. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser cette technique, et plus spécifiquement l'ELISA en sandwich. Cette variante de l'ELISA est moins commune en clinique, mais est d'un usage très courant en recherche pour détecter et quantifier un antigène dans le sérum ou tout autre échantillon.

Le procédé se déroule, dans ses grandes lignes, comme suit (Figure 12):

1. Une surface est préparée et une quantité connue d'anticorps dit *de capture* y est liée (*enrobage*).
2. L'échantillon contenant l'antigène est appliqué à la plaque (*captation*).
3. La plaque est rincée, de façon à éliminer l'antigène non-lié (*lavage*).
4. Les anticorps conjugués à l'enzyme sont ajoutés (*détection*).
5. La plaque est rincée une seconde fois.
6. Le substrat convertible par l'enzyme en signal fluorescent est ajouté (*réaction*).
7. Le résultat est analysé dans un spectrophotomètre spécialement conçu pour accepter directement les plaques de 96 puits.

Toutefois, il existe le plus souvent une étape supplémentaire, l'addition d'anticorps *de détection*, afin d'éviter de créer des anticorps conjugués à l'enzyme *pour chaque antigène*. L'utilisation d'une enzyme couplée reconnaissant la fraction Fc des autres anticorps permet de l'utiliser dans une variété de situations et de réduire le coût de la procédure.

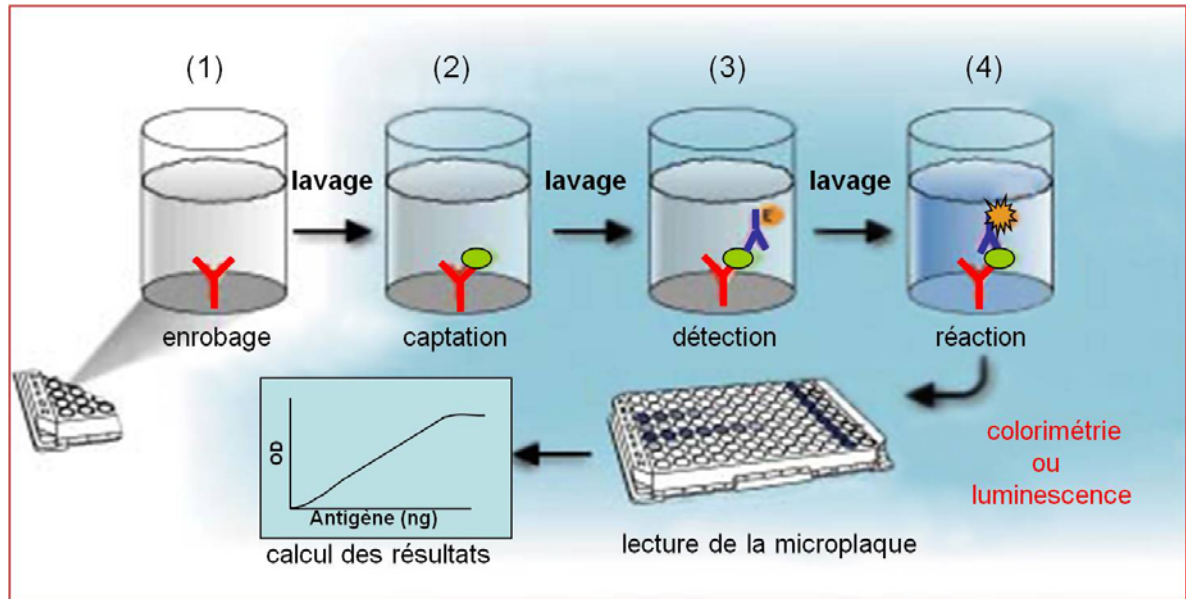


Figure 15. Un ELISA en sandwich. (1) La plaque est recouverte avec un anticorps de capture; (2) l'échantillon est ajouté, et tout antigène présent se lie à l'anticorps de capture; (3) l'anticorps de détection est ajouté, et se lie à l'antigène; (4) Le substrat est ajouté et est converti par l'enzyme en une forme détectable (colorée ou fluorescente).

Malheureusement, il n'y a pas de consensus sur la véritable concentration de PCSK9 plasmatique. Le tableau 8 résume les principales caractéristiques des différentes méthodes de détection utilisées, ainsi que les concentrations plasmatiques de PCSK9 obtenues. Plusieurs facteurs pourraient expliquer les différences observées, mais le type d'anticorps et le standard utilisé semblent être les plus probables. En effet, en analysant les résultats, il semblerait que les méthodes utilisant des anticorps polyclonaux pour mesurer la concentration plasmatique de PCSK9 donneraient des valeurs de 10 à 20 fois plus élevées que celles utilisant des anticorps monoclonaux (Tableau 8). De plus, le standard utilisé lors de l'ELISA est d'une grande importance. Le groupe de Lambert *et al.* a utilisé la même méthode d'ELISA pour 2 études, mais le standard utilisé pour la courbe d'étalonnage était différent. La concentration moyenne de PCSK9 plasmatique est passée de 2160 ng/ml à 105 ng/ml en utilisant une protéine recombinante sans tag V5 comme standard¹⁶⁴.

Tableau 8. Description des différentes méthodes de détection de la PCSK9 plasmatique.

Type de test	Type d'anticorps ¹	Nombre et type d'individus	PCSK9 ng/ml (intervalle)	Réf.
ELISA	<i>Capture</i> : monoclonal <i>Détection</i> : polyclonal contre un mélange de 2 peptides	72 volontaires	150-200 ng/ml (50-600 ng/ml)	⁷⁷
Immunoprécipitation et densitométrie	<i>Capture</i> : Polyclonal (vaccination de lapins avec l'ADN de PCSK9)	182 individus normolipidémiques	6 250 ng/ml (420-13 390 ng/ml)	^{59,165}
ELISA	<i>Capture</i> : monoclonal <i>Détection</i> : monoclonal, différent du 1 ^{er}	55 volontaires sains	Moyenne non-disponible (11-115 ng/ml)	^{58,166}
ELISA	<i>Capture</i> : polyclonal de chèvre commercial (Abcam #ab28770) <i>Détection</i> : polyclonal de lapin commercial (Cayman #10007185)	115 patients diabétiques	2 160 ng/ml (100-9 300 ng/ml)	¹⁶⁷
ELISA	<i>Capture</i> : polyclonal de lapin <i>Détection</i> : mélange de 2 anticorps monoclonaux	3138 participants au « Dallas Heart Study »	517 ng/ml (33-2 988 ng/ml)	¹⁶⁸
ELISA	<i>Capture</i> : polyclonal de lapin dirigé contre la PCSK9 tronquée <i>Détection</i> : même anticorps	254 volontaires sains 1739 enfants et adolescents	89,5 ng/ml (35-225 ng/ml) 84,7 ng/ml (17,6-211,7 ng/ml)	^{57,169}
ELISA	Voir réf. ¹⁶⁷ , mais standard différent	21 volontaires sains	105 ng/ml (11-403 ng/ml)	¹⁶⁴

¹Tous les anticorps sont dirigés contre la PCSK9 humaine, sauf indication contraire.

5.2. Distribution dans la population

La concentration plasmatique de la PCSK9 varie grandement à l'intérieur d'une même population, pouvant aller jusqu'à un intervalle de 100 fois, tel qu'observé dans la population du « Dallas Heart Study » (33-2 988 ng/mL) ¹⁶⁸. La plupart des études de distribution de PCSK9 ont montré une distribution asymétrique dite positive, car la queue de droite (valeurs hautes) est plus longue (voir la figure 1 à la section 7.2.4) ^{57,77,168}. Certains individus présentent une concentration de PCSK9 plasmatique pratiquement indétectable, tandis que d'autres présentent des valeurs plus de 5 fois supérieures à la médiane de la population ¹⁶⁸. Les causes de ces énormes variations de concentration plasmatique de PCSK9 sont encore inconnues. Plusieurs groupes, dont le nôtre, ont étudié les associations que PCSK9 pouvait avoir avec différents paramètres métaboliques. Notre étude est présentée en détail dans la section 8.

5.3. Facteurs déterminant les concentrations plasmatiques de PCSK9

5.3.1. Analyse de régression linéaire multivariée

Deux groupes ont effectué une analyse de régression linéaire multivariée pour déterminer les paramètres qui avaient une influence sur la concentration plasmatique de PCSK9 ^{168,170}. En fait, d'autres groupes ont aussi mesuré la concentration plasmatique de PCSK9 pour ensuite établir des associations avec les paramètres métaboliques, mais vu que plusieurs paramètres sont colinéaires, comme l'âge et la concentration de cholestérol plasmatique, une analyse plus poussée s'imposait. Selon nos résultats décrits dans la section 8.1.4, les principaux paramètres ayant une influence significative sur la concentration de PCSK9 étaient la concentration de cholestérol total, la concentration de glucose à jeun, la concentration de triglycérides, le sexe et l'âge. Ce modèle explique environ 27% de la variabilité interindividuelle de PCSK9 dans notre échantillon. Une étude de plus grande envergure a fait ressortir les paramètres suivants : âge, sexe, ethnie, IMC,

pression artérielle systolique, statut ménopausal, usage de statines, glycémie à jeun, LDL-C, HDL-C, triglycérides et CRP (protéine C réactive) ¹⁶⁸. Ces variables expliquaient seulement 20 % de la variance de PCSK9 dans cette population. Parmi celles-ci, le sexe, le niveau de LDL-C, les triglycérides et la prise de statines étaient fortement associés à la concentration plasmatique de la PCSK9. L'IMC et la glycémie à jeun contribuaient également à ce modèle.

5.3.2. Sexe et ethnie

Dans l'étude de la cohorte de 3 138 individus, la concentration médiane de la PCSK9 plasmatique était significativement plus élevée chez les femmes que chez les hommes ¹⁶⁸. Cette différence persiste après ajustement pour l'âge, l'ethnie, l'IMC, la pression artérielle systolique, le statut ménopausique, la glycémie à jeun, le LDL-C, le HDL-C, les TG et la CRP. Chez 1 739 enfants et adolescents, la concentration de PCSK9 plasmatique était également significativement plus élevée chez les filles ¹⁶⁹. Deux autres études comportant un nombre plus restreint de participants ont aussi montré une tendance vers une concentration plasmatique de PCSK9 plus élevée chez les femmes ^{165,170}. Pour examiner plus en profondeur les différences en les sexes pour la concentration de PCSK9, Lakoski *et al.* ¹⁶⁸ a comparé les concentrations plasmatiques de PCSK9 chez des femmes pré- et post-ménopausées et des hommes en fonction de leur âge (Figure 13). Cette étude a confirmé que le niveau de PCSK9 était toujours légèrement plus élevé chez les femmes, peu importe l'âge, et que les femmes post-ménopausées avaient un niveau significativement plus élevé de PCSK9 que les femmes pré-ménopausées ($P < 0,0001$). Cependant, la thérapie de remplacement des estrogènes n'était pas associée à une variation la concentration de PCSK9 chez les femmes post-ménopausées, suggérant que la ménopause aurait un effet sur la concentration de PCSK9, mais que cet effet serait indépendant du niveau d'estrogènes ¹⁶⁸.

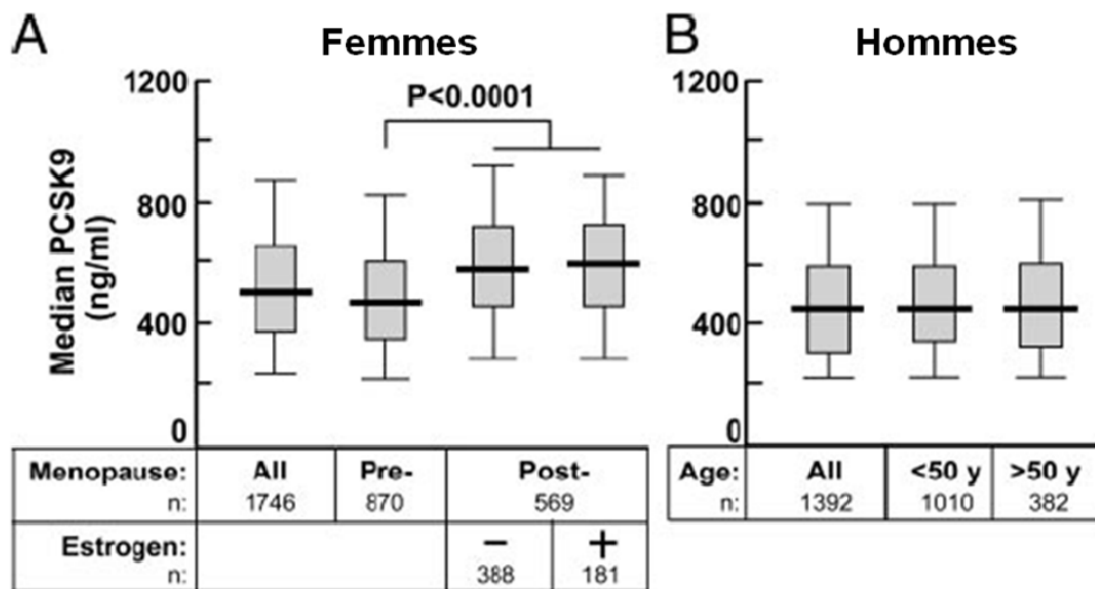


Figure 16. Effet de la ménopause et de l'usage d'œstrogènes chez la femme (A) et effet de l'âge chez l'homme (B) sur la concentration médiane de la PCSK9 plasmatique dans la cohorte « *Dallas Heart Study* ». Le niveau médian est représenté par une barre horizontale. Les rectangles gris représentent les 25^e et 75^e percentiles; les barres d'erreurs représentent les 5^e et 95^e percentiles. Tiré de Lakoski & Lagace, *J Clin Endocrinol Metab*, 2009¹⁶⁸.

La concentration médiane de la PCSK9 plasmatique était plus élevée chez les hispaniques et légèrement plus basse chez les afro-américains par rapport celle des américains d'origine européenne. Par contre, après ajustement pour l'âge, le sexe, et les TG, les différences entre les concentrations médianes de PCSK9 plasmatique entre les groupes n'étaient plus statistiquement significatives¹⁶⁸.

5.3.3. Paramètres lipidiques

Plusieurs études ont confirmé une association entre les concentrations plasmatiques de PCSK9 et celles du LDL-C^{165,167-170}. En fait, plusieurs autres paramètres lipidiques semblent être associés à la concentration plasmatique de PCSK9, mais à des degrés très variables. Trois autres groupes ont étudié ces associations et ont observé des corrélations

avec le cholestérol total (TC) ¹⁶⁷, le rapport TC/HDL-C ¹⁶⁵, les TG ^{168,170} et l'apoB ¹⁶⁹, en plus d'une corrélation avec le LDL-C. Cependant, tous les groupes s'entendent pour affirmer qu'il n'y a aucune corrélation entre la concentration plasmatique de PCSK9 et la concentration de HDL-C. Ces associations sont étudiées plus en détails dans la section 8.

6. Objectifs du projet

Dans le cadre des présents travaux de doctorat, nous nous sommes intéressés à la régulation de PCSK9 chez l'humain. En juin 2003, lors du commencement de ce projet de recherche, PCSK9 venait d'être identifié comme troisième locus impliquée dans l'hypercholestérolémie autosome dominante (ADH). Peu avant, en février 2003, Nabil G. Seidah, co-directeur de ce projet, publiait dans le journal PNAS un article caractérisant la structure de PCSK9, son expression tissulaire et son implication dans la régénération hépatique et la différenciation neuronale. PCSK9 semblait être impliqué dans le métabolisme du cholestérol, mais son rôle exact ainsi que son substrat étaient encore inconnus. Donc, nous avons décidé de vérifier la participation de PCSK9 dans l'homéostasie du cholestérol en étudiant sa régulation sous différentes conditions connues pour moduler l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. Nous nous sommes concentrés sur la régulation de PCSK9 dans les cellules humaines, lignées cellulaires et hépatocytes en culture primaire. Dans notre premier article, nous décrivons, entre autres, l'effet des statines et d'agonistes du LXR (*liver X receptor*) sur l'expression génique de *PCSK9*, dans le but de déterminer si l'expression de PCSK9 variait selon les concentrations de cholestérol. Par la suite, dans un deuxième article, nous résumons l'effet de l'ezetimibe, aussi connu pour son effet hypocholestérolémiant, sur l'expression de *PCSK9*, toujours chez les lignées cellulaires d'hépatocytes humains.

Finalement, suite à plusieurs découvertes sur PCSK9 par divers groupes de recherche, nous avons appris que cette convertase pouvait induire la destruction du LDLR et qu'elle circulait dans le sang. Nous avons donc voulu quantifier sa concentration plasmatique dans différentes populations pour en décrire la distribution et établir de possibles corrélations avec les différents paramètres métaboliques et lipidiques. Nous voulions également déterminer quels facteurs, métaboliques lipidiques et pharmacologiques, pourraient influencer la concentration plasmatique de la PCSK9. Nous avons donc mis au point un test ELISA spécifique à la PCSK9 humaine et les résultats obtenus sont décrits dans les prochaines sections.

7. Influence des statines et de l'ezetimibe sur l'expression génique de PCSK9 *in vitro*

7.1. Les statines augmentent l'expression de PCSK9, le gène encodant la proprotéine convertase subtilisin-kexin type-9 impliquée dans l'hypercholestérolémie familiale

Article #1 :

Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia.

Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, Prat A.

Publié dans *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, volume 24(8), pages 1454-1459.

L'objectif de ce premier article était d'étudier la régulation de PCSK9 au niveau de l'ARNm dans les hépatocytes humains. Geneviève Dubuc a majoritairement contribué à produire les résultats des figures 2, 3 et 4 qui impliquent la culture des cellules HepG2 et des hépatocytes humains primaires, la préparation de l'ARN pour l'amplification et la quantification de l'ARNm par PCR quantitatif (*polymerase chain reaction*) et la mesure des lipides intracellulaires et de l'apoB sécrétée. Elle a également participé à la rédaction du manuscrit. Ann Chamberland a réalisé les réactions de PCR pour générer les résultats des figures 1 à 4. Hanny Wassef a produit les résultats de la figure 1 (culture cellulaire et préparation de l'ARNm). Lise Bernier a contribué à la rédaction du manuscrit. Annik Prat a fait l'analyse du promoteur pour produire la figure 5 et a rédigé la majorité du manuscrit. Dr Jean Davignon et Nabil G. Seidah ont révisé le manuscrit et supporté le projet financièrement à l'aide de fonds des Instituts de recherche en santé du Canada (60940, MOP36496 et MCG-64518) et de Pfizer (HARG3).

7.1.1. Abstract

Objective—Neural apoptosis-regulated convertase (NARC)-1 is the newest member of the proprotein convertase family implicated in the cleavage of a variety of protein precursors. The NARC-1 gene, *PCSK9*, has been identified recently as the third locus implicated in autosomal dominant hypercholesterolemia (ADH). The 2 other known genes implicated in ADH encode the low-density lipoprotein receptor and apolipoprotein B. As an approach toward the elucidation of the physiological role(s) of NARC-1, we studied its transcriptional regulation. **Methods and Results**—Using quantitative RT-PCR, we assessed NARC-1 regulation under conditions known to regulate genes involved in cholesterol metabolism in HepG2 cells and in human primary hepatocytes. We found that NARC-1 expression was strongly induced by statins in a dose-dependent manner and that this induction was efficiently reversed by mevalonate. NARC-1 mRNA level was increased by cholesterol depletion but insensitive to liver X receptor activation. Human, mouse, and rat *PCSK9* promoters contain 2 typical conserved motifs for cholesterol regulation: a sterol regulatory element (SRE) and an Sp1 site. **Conclusions**—*PCSK9* regulation is typical of that of the genes implicated in lipoprotein metabolism. In vivo, *PCSK9* is probably a target of SRE-binding protein (SREBP)-2.

Key Words: cholesterol - QPCR - SRE - HepG2 - primary hepatocytes

7.1.2. Introduction

Neural apoptosis-regulated convertase (NARC)-1 is a serine proteinase belonging to the proteinase K subfamily of subtilases. Its acronym reflects the fact that its mRNA was upregulated when apoptosis was induced in neuronal primary cultures and that it is similar to 8 other subtilase-like proteinases, called proprotein convertases (PCs; Millenium Pharmaceuticals, patent No. WO 01/57081 A2). PCs are involved in the processing (and activation) of precursors of hormones, receptors, surface glycoproteins, etc, which transit through the secretory pathway.¹⁻³ Seven of them, PC1/3, PC2, furin, PC4, PACE4, PC5/6, and PC7/LPC, recognize basic sites and belong to the kexin subfamily. The eighth member, SKI-1/S1P,^{4,5} is classified in the pyrolysine subfamily of subtilases. It has been involved in the processing of endoplasmic reticulum (ER)-anchored transcription factors such as sterol regulatory element (SRE)-binding proteins (SREBPs) and thus plays a key role in cholesterol homeostasis.^{4,6} When cellular cholesterol is low, SREBPs are relocated from the ER to the Golgi apparatus, where SKI-1/S1P cleaves in their luminal loop. A second cleavage by the metalloprotease S2P in their first transmembrane domain liberates the cytosolic N-terminal region that goes to the nucleus and activates target genes. SREBP-1c, the isoform that is dominant in liver, regulates the lipogenic pathway, whereas SREBP-2 preferentially activates genes of cholesterol metabolism.⁷ NARC-1 is highly expressed in embryonic liver.⁸ It then decreases in the adult liver but significantly increases after hepatectomy.⁸ The transcript is also detected transiently in specific areas such as the telencephalon, skin, kidney, intestine, and cerebellum. It has been hypothesized that NARC-1 may be expressed preferentially in progenitor cells and play a role in hepatic and neuronal differentiation.⁸ In human, the NARC-1 gene, *PCSK9*, is ~22-kb long and comprises 12 exons encoding a 692-aa protein. Located on chromosome 1p32, *PCSK9* was identified recently as the third locus involved in autosomal dominant hypercholesterolemia (ADH),⁹ characterized by high levels of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, xanthomas, and a high frequency of coronary artery diseases. The majority of familial hypercholesterolemia cases are attributable to mutations in the genes encoding the LDL receptor (LDLR) and apolipoprotein B (apoB), the main component of LDL particles.¹⁰ By genetic analyses of several French families, 2 exonic NARC-1 mutations, S127R and

F216L, were associated with haplotypes segregating with the disease.⁹ This work was confirmed recently by the identification of a new *PCSK9* mutation, D374Y, in a large Utah kindred¹¹ and 2 Japanese polymorphisms, intron 1/C(-161)T and I474V,¹² all associated with abnormally high levels of LDL-cholesterol. The NARC-1 substrate(s) and physiological function(s) are still unknown. Thus, we decided to check for NARC-1 involvement in cholesterol homeostasis by studying its regulation under various conditions known to modulate the expression of genes involved in cholesterol metabolism. Quantitative RT-PCR (QPCR)^{13,14} was used to measure NARC-1 mRNA levels in the human hepatic cell line HepG2, or human primary hepatocytes. Here we report that statins, which inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-coenzyme A (CoA) reductase,^{15,16} a key enzyme in cholesterol synthesis, increased NARC-1 expression, most likely through SREBP-2 activation. In contrast, NARC-1 expression was not affected by liver X receptor (LXR) stimulation. In agreement, the NARC-1 promoter shows the typical association of conserved Sp1 and SRE-1 sites but no LXR response element.

7.1.3. Methods

7.1.3.1. Materials

Lovastatin and simvastatin were kindly provided by Merck Frosst (Montreal, Canada). Cerivastatin, atorvastatin and pitavastatin were a generous gift from Bayer (Toronto, Canada), Parke-Davis (Ann Harbor, MI, U.S.A.) and Kowa (Tokyo, Japan), respectively. Stock solutions containing 10 mM cerivastatin and atorvastatin (both in water), lovastatin and simvastatin (both in ethanol) and pitavastatin (in DMSO) were stored at -20°C until use. Compactin (mevastatin), mevalonolactone, 25-hydroxycholesterol, 22(*R*)-hydroxycholesterol, 9-*cis*-retinoic acid and cholesterol were purchased from Sigma (Toronto, Canada).

7.1.3.2. Cell culture

The human hepatoma HepG2 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 100 μ M non-essential amino acids, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS) or lipoprotein-deficient serum (LPDS), in a humidified atmosphere (5% CO₂, 37°C). All culture reagents were from Gibco-BRL (Invitrogen, Grand Island, NY). LPDS was prepared by ultracentrifugation as described¹⁷ and stored at -20°C. Typically, 10⁶ cells/well were seeded in 6-well-plates and grown to 70%-80% confluence. Primary hepatocytes were isolated from patients undergoing hepatectomy and were a generous gift from Dr Marc Bilodeau with the agreement of the institutional review committee of St-Luc Hospital (Montreal, Canada) and the informed consent of the patients. These cells were grown in William's E medium with the same additives. Before seeding, the plates were coated with a thin layer of rat tail collagen type 1 (BD Biosciences, Bedford, MA), at 5 μ g per cm².

7.1.3.3. Secreted apoB-100

After the required incubation, the medium was collected and centrifuged 10 minutes at 1500 rpm to remove cell debris. Secreted apoB-100 levels in the medium were measured by a sandwich ELISA as described¹⁸, using a goat human apoB-48/100 antibody (Biodesign, Saco, ME).

7.1.3.4. Intracellular lipids

Intracellular lipids were extracted as described¹⁹. Total cholesterol and triglycerides were determined by enzymatic methods (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). The remaining cells were digested in 2 mL 0.1N NaOH and total proteins were quantified²⁰.

7.1.3.5. RNA preparation and cDNA synthesis

Cells were washed 3 times with phosphate buffered saline (PBS) and directly incubated with Trizol reagent (Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Total RNA was extracted according to the manufacturer's recommendations and resuspended in ~ 30 μ L of water. Isolated RNA integrity was electrophoretically verified by ethidium bromide staining and optical density (OD), with an OD_{260}/OD_{280} average absorption ratio of 1.8 to 2.0.

Typically, 250 to 600 ng of total RNA were used for cDNA synthesis in a total volume of 20 μ L using SuperScript II reverse transcriptase, 25 μ g/mL oligo(dT)₁₂₋₁₈, 0.5 mM dNTPs and 40 units of RNaseOUT, all products from Life Technologies, and according to the manufacturer's recommendations.

7.1.3.6. QPCR

In a typical experiment, each cDNA sample was submitted to two PCR amplifications, one for the normalizing ribosomal protein S14 gene and the other for the gene of interest, each in triplicate. Each reaction was in a final volume of 25 μ L, using the QuantiTec SYBR Green PCR Master mix from Qiagen (Mississauga, ON, Canada), cDNA dilutions that gave comparable Ct values for both amplifications, and primers for S14 or the chosen target gene (Table 1). All primers (Life Technologies) were designed using Primer3 software (http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) to produce amplicons that overlap exonic splicing junctions to avoid genomic DNA amplification. Oligonucleotide concentrations were optimized for each amplification. The PCR program comprised a polymerase activation step (15 minutes at 95°C) followed by 40 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 58°C and 30 seconds at 72°C. The Mx4000 system from Stratagene (La Jolla, CA) was used to perform and analyze the QPCR reactions, using S14 amplifications as normalizers and control samples as calibrators. Excel software was used

for standard deviation (SD) and Student test calculations. The data shown correspond to representative experiments.

Primers for QPCR

Assessed mRNA	Forward Primer	Reverse Primer
human S14	GGCAGACCGAGATGAATCCTCA	CAGGTCCAGGGGTCTTGGTCC
human NARC-1	ATCCACGCTTCCTGCTGC	CACGGTCACCTGCTCCTG
human LDLR	AGGAGACGTGCTTGTCTGTC	CTGAGCCGTTGTGCGAGT
human SKI-1	CAAGTGAGGCCCTTGTC	CTCCCAGGAAGGCAAAGAC
human SREBP-1	ATCGACTACATTGCTTTCT	CAGATCCTTCAGAGATTTGC
human SREBP-2	AGAATGTCCTTCTGATGTCC	GGAGAGTCTGGCTCATCTT

7.1.4. Results

NARC-1 is upregulated by statins

Because NARC-1 seemed to be involved in cholesterol metabolism and that patients responded well to statin treatment, we studied the effect of 5 different statins on NARC-1 expression. HepG2 cells were treated with 1 μ M cerivastatin, atorvastatin, lovastatin, simvastatin or pitavastatin. The expression of the LDLR gene, which is known to be upregulated by statins, was used as a positive control. Statin treatment significantly increased *PCSK9* expression, by a factor of ~ 3 for cerivastatin and 1.5 for the other statins (Figure 1A). This increase was confirmed when HepG2 cells were treated with increasing concentrations of statins. The dose-dependent response induced by atorvastatin is shown in Figure 1B. *PCSK9* expression was upregulated ~ 7.5 -fold by 10 μ M atorvastatin while, under the same conditions, LDLR expression increased by only 2.5-fold. By inhibiting HMG-CoA reductase, an enzyme of the cholesterol synthesis pathway, statins induce a cellular depletion in cholesterol. In contrast to NARC-1 and LDLR, SKI-1 that cleaves SREBPs upon cholesterol depletion was not regulated at the transcriptional level by statin treatment (Figure1B).

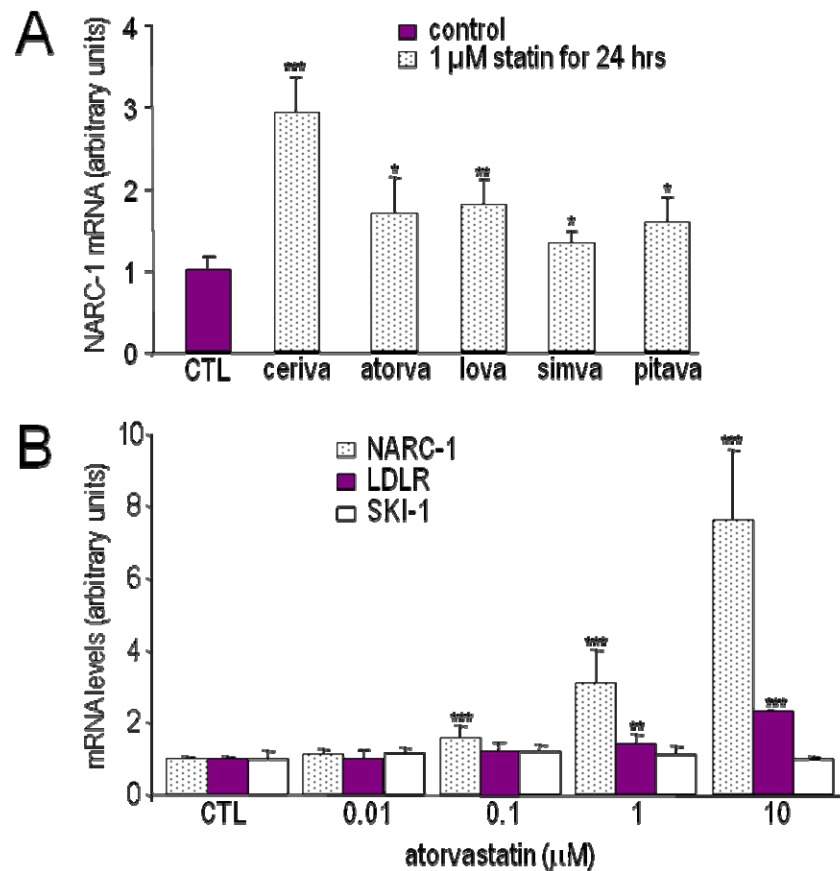


Figure 1. NARC-1 is upregulated by statins in HepG2 cells. HepG2 cells were treated (A) for 24 hours with 1 μ mol/L of cerivastatin, atorvastatin, simvastatin, or pitavastatin (3 to 4 mRNA samples were analyzed in duplicates) and (B) for 48 hours with atorvastatin (2 independent experiments, each with 4 mRNA samples in duplicate). Gene expression levels were quantified by QPCR. Bars represent the mean \pm SD, and asterisks represent *P* values according to the Student test (**P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001).

NARC-1 is upregulated by cholesterol depletion

To verify whether NARC-1 mRNA upregulation was due to inhibition of cholesterol synthesis or to another effect of statins, we quantified *PCSK9* expression in the presence or absence of sterols, a mixture of cholesterol and 25-hydroxycholesterol (Figure 2). In both HepG2 cells and human hepatocytes in primary culture, NARC-1 mRNA level

was upregulated, albeit to a higher extent in HepG2 cells (5 versus a 2-fold increase in primary hepatocytes). In HepG2 cells, LDLR and SREBP-2 mRNA levels were also upregulated (2-fold) while that of SREBP-1 remained unaffected, as previously reported^{21,22}. As expected, in the absence of exogenous sterols, the intracellular cholesterol and the levels of apoB in the medium were reduced while intracellular triglycerides were increased (Figure 2, inset). These data suggested that statin-induced upregulation of NARC-1 was mediated by the cholesterol lowering effect of statins.

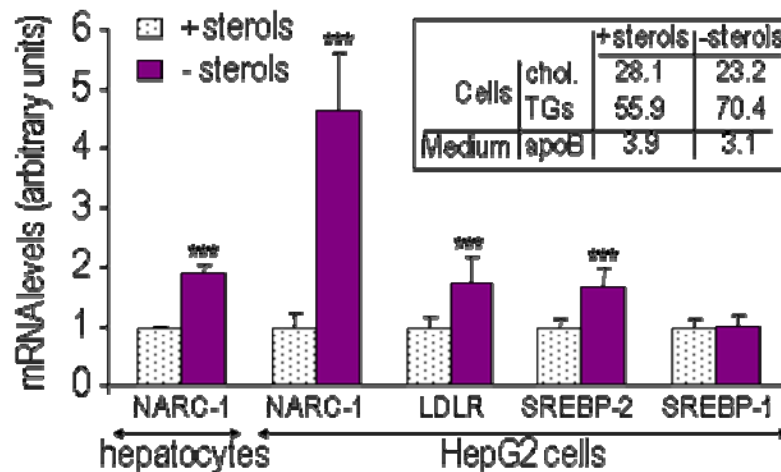


Figure 2. NARC-1 is upregulated by cholesterol depletion. Human primary hepatocytes or HepG2 cells were incubated for 18 hours in 5% LPDS, 50 $\mu\text{mol/L}$ mevastatin, and 50 $\mu\text{mol/L}$ mevalonolactone in absence (-sterols) or presence (+sterols) of 1 $\mu\text{g/mL}$ 25-hydroxycholesterol and 10 $\mu\text{g/mL}$ cholesterol. Gene-specific expression was measured by QPCR. Two to 3 cDNAs were analyzed in triplicate. Bars represent the mean \pm SD, and 3 asterisks represent a P value of <0.001 (Student test). Values for intracellular cholesterol (chol.) and triglycerides (TGs) and extracellular apoB are given in micrograms per milligram of cellular proteins (inset).

Statin-induced upregulation of NARC-1 was reversed by addition of mevalonate

The above hypothesis was verified by treating HepG2 cells or primary hepatocytes with atorvastatin in the absence or presence of mevalonate (Figure 3). Mevalonate was expected to prevent the cholesterol depletion caused by statin since it is the product of the

reaction catalyzed by HMG-CoA reductase. Analysis of the expression levels of NARC-1 and LDLR showed that addition of mevalonate efficiently reversed both NARC-1 and LDLR upregulations. As in Figure 2, NARC-1 upregulation was higher than that of LDLR (2-fold). Interestingly, NARC-1 downregulation by addition of mevalonate was also more drastic than that of LDLR. It is important to note that, in HepG2 cells and hepatocytes at 1 μ M statin, mevalonate lowers NARC-1 (but not LDLR) level below that of the control, suggesting that *PCSK9* is more tightly regulated by cholesterol than the LDLR gene.

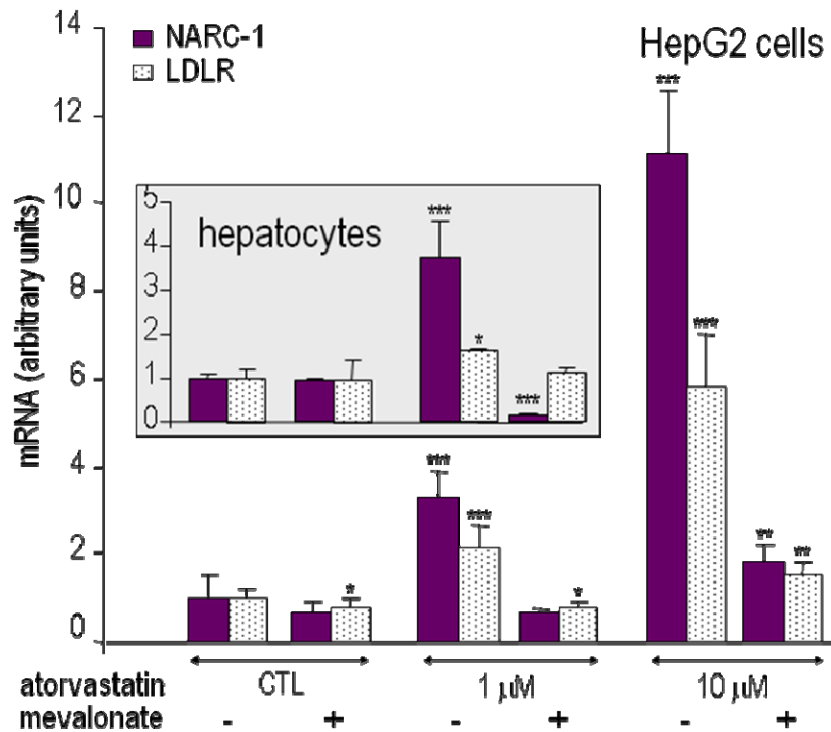


Figure 3. The statin-induced upregulation of NARC-1 is reversed by addition of mevalonate. After a 24-hour preincubation in 10% LPDS, HepG2 cells were incubated in the same medium for 48 hours in absence (CTL) or presence of 1 or 10 μ mol/L atorvastatin with (+) or without (-) 2.5 mmol/L mevalonolactone (mevalonate). Because of statin toxicity, primary hepatocytes (inset) were treated with only 1 μ mol/L atorvastatin for 24 hours after a 12-hour preincubation. Gene-specific expression was measured by QPCR. Two to 4 cDNAs were analyzed in triplicate. Bars represent

the mean \pm SD, and asterisks represent *P* values according to the Student test (**P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001).

NARC-1 is not affected by LXR induction

While SREBP-2 is the prominent factor that regulates cholesterol synthesis and uptake, the transcription factor LXR plays a key role in cholesterol elimination²³. LXR is a nuclear hormone receptor that binds oxysterols and activates its target genes, such as *CYP7A* encoding the rate-limiting enzyme in the conversion of cholesterol to bile acids, by dimerizing with retinoid X receptor (RXR)²⁴. *PCSK9* regulation was assessed in the absence or presence of 22(R)-hydroxycholesterol, one of the most potent oxysterols²⁵ for LXR activation (Figure 4). Because LXR also plays a role in fatty acid metabolism through SREBP-1 upregulation²⁶, we measured both SREBP-1 and SREBP-2 expression levels as positive and negative controls, respectively. As expected, SREBP-2 mRNA remained stable while SREBP-1 mRNA was upregulated 3-fold in the presence of 22(R)-hydroxycholesterol, an effect comparable to the 2.5-fold increase found in HepG2 cells stimulated with a synthetic LXR agonist²⁶ or in mice fed the same agonist²⁷. Under these conditions, NARC-1 expression level was not upregulated.

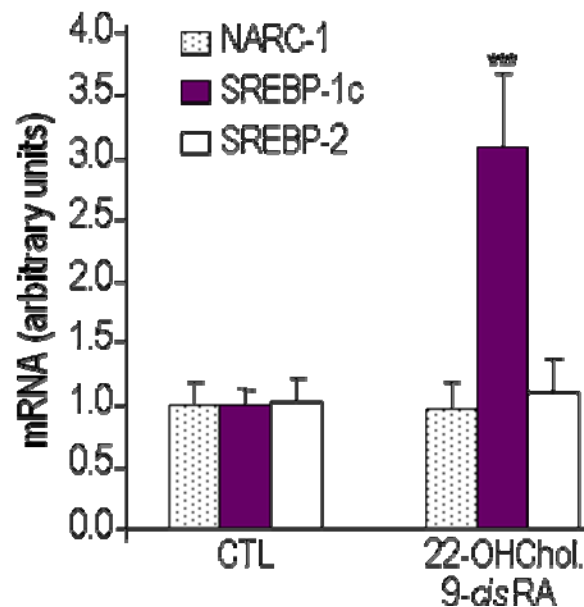


Figure 4. NARC-1 is insensitive to LXR activation. HepG2 cells were washed twice in PBS for 1 hour and incubated for 24 hours in DMEM containing 2 mg/mL BSA with either vehicle (CTL) or 2.5 μ g/mL 22-hydroxycholesterol and 10 μ mol/L 9-*cis*-retinoic acid (RA), which are LXR and RXR³⁹ activators, respectively. Six cDNAs were analyzed in triplicate. Bars represent the mean \pm SD, and 3 asterisks represent a *P* value of <0.001 (Student test).

Comparative analysis of human, mouse and rat *PCSK9* promoters

Regulation of NARC-1 mRNA levels by cholesterol was strongly in favor of a SREBP-2-mediated effect. The latter activates cholesterol biosynthetic genes by binding to SREs exhibiting adjacent sites for Sp1 and/or NF-Y cofactors^{28,29}. Human, mouse and rat promoters were analyzed using the MatInspector Software and the identified consensus binding motifs for SREBPs, Sp1 and NF-Y are schematically represented in Figure 5. Both mouse and rat sequences exhibit, in addition to an ATG codon aligned with that of the human sequence, an upstream ATG that extends their open reading frame of 13 and 55 codons, respectively. Whether these upstream ATGs are *bona fide* translation initiation sites remains to be determined. Only two sites, separated by \sim 75 bp, were perfectly conserved in the *PCSK9* proximal promoter of the three species: a SRE (ATCACGCCAC) at -337, -227 and -218, and a Sp1 site (GGGGAGGGC) at -430, -320 and -313 in human, mouse and rat sequences, respectively. In the *LDLR* promoter, the orientation of the SRE-1 (-159; ATCACCCCAC) and the most important Sp1 site (-144; GGGGAGGAG) is inverted compared to that observed in *PCSK9* promoter. As symbolized by the dotted line in Figure 5, *PCSK9* SRE and the Sp1 site are comprised in a \sim 200 nucleotide conserved area of the promoter (basically no gaps and 90% identity between human and mouse sequences). In the proximal region, aside from important gaps in mouse and rat sequences (equivalent to 37% of the human sequence), human and mouse promoters share only 66% identity. In the distal region, the identity is 58%. Two (human) and one (mouse and rat) other SREs with adjacent Sp1 and/or NF-Y sites were present further upstream in the *PCSK9* promoter (not shown) and may also contribute to gene regulation by sterols. Consistent with the absence of a significant increase of NARC-1 mRNA expression by

LXR activation (Figure 4), no conserved LXR response element was detected in the *PCSK9* promoter.

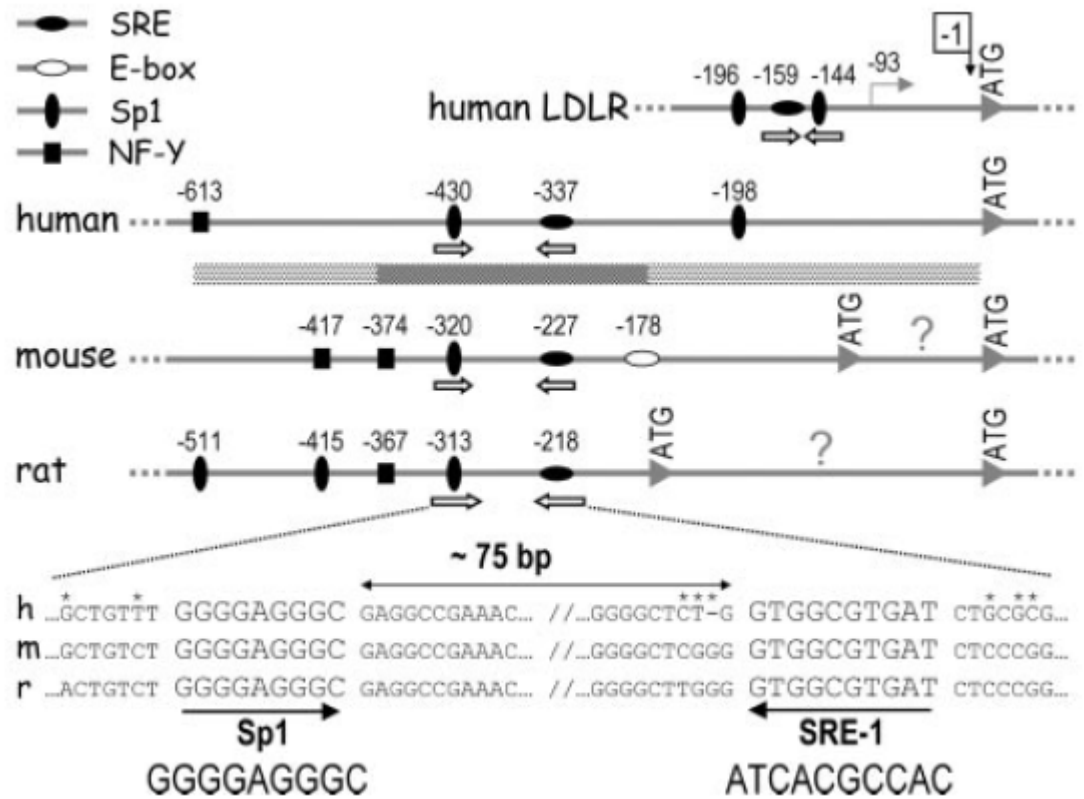


Figure 5. Comparative analysis of human, mouse, and rat NARC-1 promoters. The Mat Inspector software 2.2 was used to detect SRE/E-box, Sp1, and NF-Y consensus motifs. No information was available on transcription or translation initiation sites. Position -1 was fixed arbitrarily to the nucleotide preceding the conserved ATG codon, which is the first in human and the second in mouse and rat sequences. The shift between the human and mouse/rat numbering is attributable to important gaps (~110 positions of the human sequence) in mouse and rat sequences in the proximal region. Density of dots in the thick dotted line correlates with sequence identity. Open arrows represent SRE and Sp1 site orientations. The question mark and the asterisks indicate regions that may or may not be translated and variable nucleotide positions, respectively.

7.1.5. Discussion

Our results showed that the NARC-1 gene, *PCSK9*, involved in familial hypercholesterolemia^{9,11,12}, is regulated as a typical cholesterologenic gene. We showed for the first time that NARC-1 mRNA expression was upregulated by statins (Figure 1) and cholesterol depletion (Figure 2), ~ 2-fold more than that of LDLR. The statin-induced upregulation of *PCSK9* was quantitatively reversed by addition of mevalonate (Figure 3). This indicated that the effect of statins was due to the inhibition of HMG-CoA reductase and not to other effect(s) of the pleiotropic statins^{16,30}. NARC-1 upregulation was therefore most probably due to the cholesterol lowering effect of the drug. This is the first study of NARC-1 regulation in human cells. The data obtained in HepG2 cells were similar to that observed in human hepatocytes in primary culture (Figures 2 and 3), thereby validating the studies in HepG2 cells.

Our *in vitro* results are in agreement with a recent study by Breslow and collaborators who identified *PCSK9* as a putative member of the family of genes involved in cholesterol homeostasis, using a DNA micro-array approach³¹. They found a ~ 2-fold decrease in NARC-1 mRNA levels in livers of mice fed a cholesterol-rich diet. In contrast, *PCSK9* was highly upregulated in SREBP-2 transgenic mice.

Interestingly, they also showed a slight increase (1.6-fold) in NARC-1 transcripts in liver from mice treated with an LXR agonist³¹. The latter observation could not be confirmed in our study, a discrepancy that may reflect species-specific regulations or *in vivo* versus *in vitro* variations. In addition, genes whose expression is repressed by an excess of cholesterol and upregulated by SREBP-2 are usually not LXR targets. Finally, another DNA micro-array study confirmed the above results and showed that in *Scap*^{-/-} liver, in which SREBP activation cannot take place, NARC-1 messengers were reduced³².

Human, mouse and rat NARC-1 promoters share two conserved sites for transcription factor binding, Sp1 and SRE. The NARC-1 SRE differs from the classical LDLR SRE-1 (ATCACCCCAC) by one transversion at position 6 (C to G), not shown to affect SREBP-2 binding³³. It has been suggested that, in *LDLR* promoter, the respective directional binding of SREBP-2 and Sp1 to their sites, which are head to head in repeats 2 and 3, allows the interaction of SREBP-2 with the N-terminal region of Sp1 and facilitates Sp1 recruitment²⁸ (Figure 5). Because of the mirror image of the SRE and Sp1 site disposition in the *PCSK9* promoter, it is possible that the same interaction takes place. *In vitro* studies⁷ demonstrated that SREBP-2 binds efficiently to classical SRE, while SREBP-1c shows little binding. The absence of a conserved E-box, which is known to be preferred by SREBP-1c⁷, is also in favor of NARC-1 regulation by SREBP-2. NARC-1 is particularly abundant in liver and small intestine⁸. Further studies will define if the sterol regulation of the *PCSK9* requires tissue-specific factors, such as hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 that was shown to be essential for the SREBP-2 activation of sterol Δ^8 -isomerase³⁴.

The absence of an LXR-mediated upregulation of NARC-1 is not in favor of its implication in cholesterol catabolism. Our data rather suggest that the enzyme is implicated in cholesterol biosynthesis and/or uptake. The fact that patients harboring a mutated *PCSK9* have high plasma cholesterol levels reinforces a putative role of NARC-1 in LDL uptake. The autoprocessing site of NARC-1 has been recently identified³⁵ (Benjannet et al., *submitted*) and further studies that will better define NARC-1 cleavage specificity should help in identifying NARC-1 substrate(s). The dominant character of *PCSK9* mutations could be due either to a dominant negative or gene dosage effect. The S127R⁹ and D374Y¹¹ mutations that have been associated with ADH partially and totally abrogated NARC-1 autocatalytic zymogen processing, respectively (Benjannet et al., *submitted*), supporting a correlation with the enzyme activity. However, we cannot exclude that these mutations generated dominant negative forms of the enzyme that acquired novel deleterious

properties, which may have no relation with the normal physiological function(s) of NARC-1, as reported for superoxide dismutase 1³⁶. Nevertheless, because the enzyme belongs to the PC family, it is tempting to hypothesize that an as yet unknown substrate(s), activated by NARC-1, is an essential actor in the cholesterol pathway. Identification of NARC-1 substrates may lead to the elucidation of disease mechanism(s) and these substrates may constitute targets for new strategies to limit elevation of LDL particles and prevent morbidity and mortality from premature atherosclerosis.

In addition, and as reflected by its acronym, NARC-1 was shown to be upregulated by induction of apoptosis in primary culture of neurons. Caspase 3, which has a pivotal role in apoptosis, was reported to generate active SREBPs^{37,38}. By using reporter genes under the control of the *LDLR* SRE and Sp1 sites, Higgins and Ioannou³⁸ showed that the two elements mediated a sterol-independent upregulation of the reporter genes, very early upon induction of apoptosis. The physiological relevance of the stimulation of SREBP targets in apoptotic cells remains unclear. It will be important to verify if the identified *PCSK9* SRE and Sp1 site also mediate the increased expression of NARC-1 observed upon induction of apoptosis. To date, we cannot exclude that NARC-1 may play an important role in cholesterol homeostasis and apoptosis, both of which may be functionally related.

7.1.6. Acknowledgments

GD is a recipient of a Clinical Research Institute of Montreal studentship award. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grants 60940, MOP 36496 and MGC-64518 and a Pfizer grant HARG3.

7.1.7. References

1. Seidah NG, Chretien M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* 1999;848:45-62.

2. Taylor NA, Van De Ven WJ, Creemers JW. Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *FASEB J.* 2003;17:1215-1227.
3. Zhou A, Webb G, Zhu X, Steiner DF. Proteolytic processing in the secretory pathway. *J Biol Chem.* 1999;274:20745-20748.
4. Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL, Brown MS. Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell.* 1998;2:505-514.
5. Seidah NG, Mowla SJ, Hamelin J, Mamarbachi AM, Benjannet S, Toure BB, Basak A, Munzer JS, Marcinkiewicz J, Zhong M, Barale JC, Lazure C, Murphy RA, Chretien M, Marcinkiewicz M. 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.* 1999;96:1321-1326.
6. Goldstein JL, Rawson RB, Brown MS. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch Biochem Biophys.* 2002;397:139-148.
7. Amemiya-Kudo M, Shimano H, Hastay AH, Yahagi N, Yoshikawa T, Matsuzaka T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Sato R, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N. Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res.* 2002;43:1220-1235.
8. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A, Chretien M. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:928-933.

9. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Villegier L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34:154-156.
10. Goldstein JL, Brown MS. In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS, eds. *The metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York; 1983:1981-1983.
11. Timms KM, Wagner S, Samuels ME, Forbey K, Goldfine H, Jammulapati S, Skolnick MH, Hopkins PN, Hunt SC, Shattuck DM. A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet.* 2004;114:349-353.
12. Shioji K, Mannami T, Kokubo Y, Inamoto N, Takagi S, Goto Y, Nonogi H, Iwai N. Genetic variants in PCSK9 affect the cholesterol level in Japanese. *J Hum Genet.* 2004;49:109-114.
13. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:e45.
14. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:e36.
15. Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1976;29:1346-1348.

16. Davignon J. The cardioprotective effects of statins. *Curr Atheroscler Rep.* 2004;6:27-35.
17. Goldstein JL, Basu SK, Brown MS. Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol.* 1983;98:241-260.
18. Cohn JS, Tremblay M, Amiot M, Bouthillier D, Roy M, Genest J, Jr., Davignon J. Plasma concentration of apolipoprotein E in intermediate-sized remnant-like lipoproteins in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:149-159.
19. De Hoff JL, Davidson LM, Kritchevsky D. An enzymatic assay for determining free and total cholesterol in tissue. *Clin Chem.* 1978;24:433-435.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Far AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
21. Sato R, Inoue J, Kawabe Y, Kodama T, Takano T, Maeda M. Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem.* 1996;271:26461-26464.
22. Scharnagl H, Schinker R, Gierens H, Nauck M, Wieland H, Marz W. Effect of atorvastatin, simvastatin, and lovastatin on the metabolism of cholesterol and triacylglycerides in HepG2 cells. *Biochem Pharmacol.* 2001;62:1545-1555.
23. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:459-481.
24. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature.* 1996;383:728-731.

25. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 1997;272:3137-3140.
26. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 2000;14:2831-2838.
27. Stulnig TM, Steffensen KR, Gao H, Reimers M, Dahlman-Wright K, Schuster GU, Gustafsson JA. Novel roles of liver X receptors exposed by gene expression profiling in liver and adipose tissue. *Mol Pharmacol.* 2002;62:1299-1305.
28. Sanchez HB, Yieh L, Osborne TF. Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem.* 1995;270:1161-1169.
29. Magana MM, Koo SH, Towle HC, Osborne TF. Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase. *J Biol Chem.* 2000;275:4726-4733.
30. Davignon J, Laaksonen R. Low-density lipoprotein-independent effects of statins. *Curr Opin Lipidol.* 1999;10:543-559.
31. 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.* 2003;44:2109-2119.
32. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic

and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12027-12032.

33. Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem*. 1993;268:14490-14496.

34. Misawa K, Horiba T, Arimura N, Hirano Y, Inoue J, Emoto N, Shimano H, Shimizu M, Sato R. Sterol regulatory element-binding protein-2 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 to enhance sterol isomerase gene expression in hepatocytes. *J Biol Chem*. 2003;278:36176-36182.

35. Naureckiene S, Ma L, Sreekumar K, Purandare U, Lo CF, Huang Y, Chiang LW, Grenier JM, Ozenberger BA, Jacobsen JS, Kennedy JD, DiStefano PS, Wood A, Bingham B. Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch Biochem Biophys*. 2003;420:55-67.

36. Kunst CB, Mezey E, Brownstein MJ, Patterson D. Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions. *Nat Genet*. 1997;15:91-94.

37. Pai JT, Brown MS, Goldstein JL. Purification and cDNA cloning of a second apoptosis-related cysteine protease that cleaves and activates sterol regulatory element binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:5437-5442.

38. Higgins ME, Ioannou YA. Apoptosis-induced release of mature sterol regulatory element-binding proteins activates sterol-responsive genes. *J Lipid Res*. 2001;42:1939-1946.

39. Denis M, Bissonnette R, Haidar B, Krimbou L, Bouvier M, Genest J. Expression, regulation, and activity of ABCA1 in human cell lines. *Mol Genet Metab.* 2003;78:265-274.

7.2. Les statines et l'ezetimibe modulent les niveaux plasmatiques de PCSK9

Article #2 :

Statins and ezetimibe modulate plasma proprotein convertase subtilisin Kexin-9 (PCSK9) levels.

Davignon J, Dubuc G.

Publié dans *Trans Am Clin Climatol Assoc.*, 2009, volume 120, pages 163-73.

Cet article est un compte rendu de la présentation de Dr Jean Davignon à une réunion de l'American Clinical and Climatological Association, en octobre 2008. L'objectif de ce deuxième article était d'étudier l'effet de l'ezetimibe sur l'expression de PCSK9 dans les hépatocytes (HepG2) et les cellules épithéliales intestinales (Caco-2) humaines. Geneviève Dubuc a majoritairement contribué à la production de tous les résultats présentés dans cet article, avec l'aide des associés de recherche du laboratoire. Dr Jean Davignon a rédigé le manuscrit et a supporté financièrement le projet (Pfizer; HARG3).

7.2.1. Abstract

PCSK9 is a natural inhibitor of the LDL receptor. Gain-of-function mutations may cause the familial hypercholesterolemia phenotype, whereas loss-of-function variants associate with reduced LDL-C levels and lower coronary risk. Statins up-regulate PCSK9 in hepatocytes. We developed an assay to measure total PCSK9 in human plasma and evaluated the effect of statins and ezetimibe on PCSK9 *in vivo* and *in vitro*. In 254 normal subjects, the mean plasma PCSK9 was 89 ± 32 ng/ml. PCSK9 levels correlated with plasma cholesterol, LDL-C, triglycerides, fasting glucose, age and body mass index. Sequencing PCSK9 from subjects at the extremes of plasma distribution revealed new variants. In 200 hypercholesterolemic patients, circulating PCSK9 was higher than in controls, increased with increasing statin dose, and further increased when ezetimibe was added. However, ezetimibe treatment of HepG2 (hepatocytes) and Caco-2 (enterocytes) cells caused a slight increase in PCSK9 and NPC1L1 mRNA, but no significant rise in PCSK9 protein secretion, suggesting that these transformed cells are not ideal model cell lines.

7.2.2. Introduction

The familial hypercholesterolemia (FH) phenotype is typically characterized by plasma low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) greater than the 95th percentile, presence of tendon xanthomas and premature atherosclerosis. Anomalies of three autosomal genes are associated with this phenotype expressed in a co-dominant or dominant fashion: 1) mutations of the LDL-receptor gene (*LDLR*) on chromosome 19p13 (over 900 mutations reported) associate with “classical” familial hypercholesterolemia (FH-1); 2) a defect in the apolipoprotein B (apoB) gene on chromosome 2p23-24 is referred to as “familial defective apoB-100” (FH-2), or 3) by a mutation of the PCSK9 gene as discovered more recently by Abifadel et al. (1) and referred to as FH-3. It is estimated that they account for 67%, 14% and 2.3% respectively of all autosomal dominant cases of FH, about 16.7% still being unaccounted for (2). The FH phenotype may also be ascribed to

recessive mutations such as in autosomal recessive hypercholesterolemia (*ARH* gene on chromosome 1p35-36). (See reference 3 for review).

The proprotein-convertase-subtilisin-kexin type-9 (PCSK9) is a 692-amino acid serine protease of 72 kDa that is encoded by the *PCSK9* gene on chromosome 1p32.3. Formerly called neural apoptosis regulated convertase-1 (NARC-1), it is a member of the proprotein convertase family of enzymes that act as molecular scissors for the tissue-specific processing of multiple precursor proteins such as growth factors, neuropeptides, receptors, enzymes, transcription factors, viruses and others (4). This family includes 9 members: PC1, PC2, furin, PC4, PC5, PACE4, PC7, SKI-1 (or S1P or PC8), and PCSK9 (or PC9). The only known enzymatic function of PCSK9 is limited to its own intramolecular autocatalytic processing of proPCSK9 into PCSK9 in the endoplasmic reticulum (ER), which is necessary for its activation, secretion and function. There is no other substrate known to date. The primary cleavage separates the 122 amino acid prodomain in the ER, which remains associated with the catalytic domain and inhibits its protease activity. The major function of the heterodimeric prosegment-PCSK9 is to degrade the LDLR intracellularly. It acts as a chaperone that binds to the LDLR on its epidermal growth factor-like repeat A domain (EGF-A) to promote its lysosomal degradation. In adults, PCSK9 is produced primarily by the liver and intestine, but only the liver releases it into the circulation (5). It is degraded in plasma where it is cut at amino acid 218 by furin, another proprotein convertase, generating a residue of 474 amino acids. PCSK9 became a source of major interest in the lipoprotein field when it was discovered that it had an important role in cholesterol homeostasis and that mutations of *PCSK9* could be associated with either hypercholesterolemia (gain-of-function mutations) or hypocholesterolemia (loss-of-function mutations) (6). Lowered plasma LDL-C and apoB from birth with the loss-of-function mutations were associated with reduced coronary artery disease risk in both Caucasians and African-Americans (7).

We previously reported that statins up-regulate PCSK9 in hepatocytes (a new pleiotropic effect of statins) to a greater extent than they up-regulate the LDLR itself (8). This revealed the paradox that statins on the one hand enhance LDLR activity thereby lowering LDL-cholesterol (LDL-C), but on the other hand they increase the expression of PCSK9 which has the ability to destroy the LDLR and oppose its LDL-lowering effect (9). We developed an assay to measure total PCSK9 in human plasma and evaluated the effect of statins and ezetimibe on PCSK9 concentrations (10) and will review here the *in vivo* and *in vitro* results of these studies.

7.2.3. Methods

PCSK9 Assay: We originally obtained a rabbit polyclonal antibody against truncated (amino acid 31-454) recombinant human PCSK9 (hPCSK9-Ab) (11). The latter was then purified by precipitation with ammonium sulfate and affinity chromatography on a CNBr-activated Sepharose 4B column coupled with the purified antigen. A fraction of this purified antibody was conjugated with horseradish peroxidase (HRP) and further purified to remove excess HRP. This served to develop an enzyme-linked immunosorbent sandwich assay (ELISA). Wells were coated with the hPCSK9-Ab (0.5 µg per well), the plasma added was diluted 1:20 for capture. After washing, HRP-conjugated polyclonal anti-PCSK9-Ab was added and combined with a luminol-enhanced HRP substrate for chemiluminescence detection. For immunoblotting, immunoprecipitation of plasma and culture medium was carried out using hPCSK9-Ab and activated agarose beads coupled with goat anti-rabbit IgG. For detection, hPCSK9-Ab-HRP was used at a dilution of 1:500. The blots were revealed by chemiluminescence.

Cell culture: Human hepatoma HepG2 cells and human epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells were grown in DMEM containing 100 µmol/L nonessential amino acids, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 10% fetal bovine serum (FBS) or lipoprotein-deficient serum (LPDS), in a humidified atmosphere (5% CO₂, 37°C).

Typically, 10^6 cells per well were seeded in 6-well plates and grown to 70% to 80% confluence. The mRNA of PCSK9 and Nieman-Pick C1-like-1 protein (NPC1L1, the target of ezetimibe for inhibiting cholesterol absorption) were measured by quantitative RT-PCR.

Subjects and laboratory measurements: Blood from 254 healthy volunteers (117 M, 137 F), over 18 years of age and not taking any medication for hyperlipidemia, hypertension or diabetes, and 200 hyperlipidemic patients attending our lipid clinic was collected into EDTA-Vacutainer™ tubes after a 12h fast. Patients entered the study whether before or on treatment and, if treated, regardless of the nature or dose of statin administered. The majority had combined hyperlipidemia. Some received a combination of a statin and 10 mg of ezetimibe daily. Fifty-nine patients received no lipid-lowering medication, 98 were on a statin (55 on atorvastatin, 27 on rosuvastatin, 14 on simvastatin and 2 on pravastatin), 39 on a statin-ezetimibe combination and 4 on ezetimibe treatment only. Plasma cholesterol, triglycerides (TG) and glucose were quantified at the laboratory of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) using standard laboratory procedures on a Bayer Advia multi-analyzer. Leukocyte DNA was extracted with QIAmp Blood Maxi Kit (Qiagen, Missisauga, ON) according to manufacturer's instructions. The sequences of the primers used for amplifying all 12 exons of PCSK9 were obtained from NCBI at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/variantseqr>. The amplified fragments were purified from agarose gels and sequenced on a 3130 XL Genetic analyzer from ABI (Applied Biosystem, Foster City, CA) using M13 sequencing primers. Sequences were analyzed with Sequencher™ software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). All subjects gave a written informed consent and the IRCM ethics committee approved the protocol. Spearman correlation coefficient (r) was used to assess the relationship between parameters. Data were analyzed with Graph-Pad Prism®5 software and significance defined as $p < 0.05$ (two-sided).

7.2.4. Results

In healthy volunteers, there was no significant difference in plasma PCSK9 or in any of the other parameters measured between men and women (Mann Whitney *U* test). Distribution of plasma PCSK9 levels measured by ELISA was skewed towards higher values in both men and women (Figure 1). The mean concentration was 89 ± 32 ng/ml (range 35 to 225 ng/ml). It did not differ significantly between men and women (85 ± 27 ng/ml and 93 ± 35 ng/ml respectively). The mean age was 42 ± 13 yrs, (range, 20 to 77 for men and 21 to 69 for women). Plasma PCSK9 was significantly correlated with total cholesterol ($r = 0.382$, $p < 0.001$), LDL-C ($r = 0.351$, $p < 0.001$), triglycerides ($r = 0.356$, $p < 0.001$), fasting glucose ($r = 0.354$, $p < 0.001$), BMI ($r = 0.264$, $p < 0.001$) and age ($r = 0.376$, $p < 0.001$). No significant correlation was observed with HDL-C (10).

Sequencing the coding exons of the *PCSK9* gene from patients at the extreme of the distribution of plasma PCSK9 concentrations disclosed 5 mutations or variants in the low end of the distribution (levels less than 60 ng/ml) and 2 in the upper end (levels greater than 150 ng/ml). In the first instance two (R434W and Q190R) with plasma PCSK9 of 51 and 55 ng/ml and LDL-C of 75 and 150 mg/dl respectively had not been reported before. The others were R46L twice and R53V plus L10 (an extra leucine in the leucine stretch of the signal peptide) in the same subject with PCSK9 levels of 51, 59 and 39 ng/ml and of LDL-C of 129, 99 and 119 mg/dl of LDL-C respectively. In the second instance one variant (G365R) that was associated with a plasma PCSK9 concentration of 205 ng/ml (LDL-C of 111 mg/dl) had not been previously reported either. The other, A433T (PCSK9 of 222 ng/ml, and LDL-C of 139 mg/dl) had been reported to render PCSK9 more susceptible to furin cleavage (12). This large number of variants for a relatively small sample size suggests that a founder effect exists for such mutations in this French-Canadian population as is the case for *LDLR* defects (13).

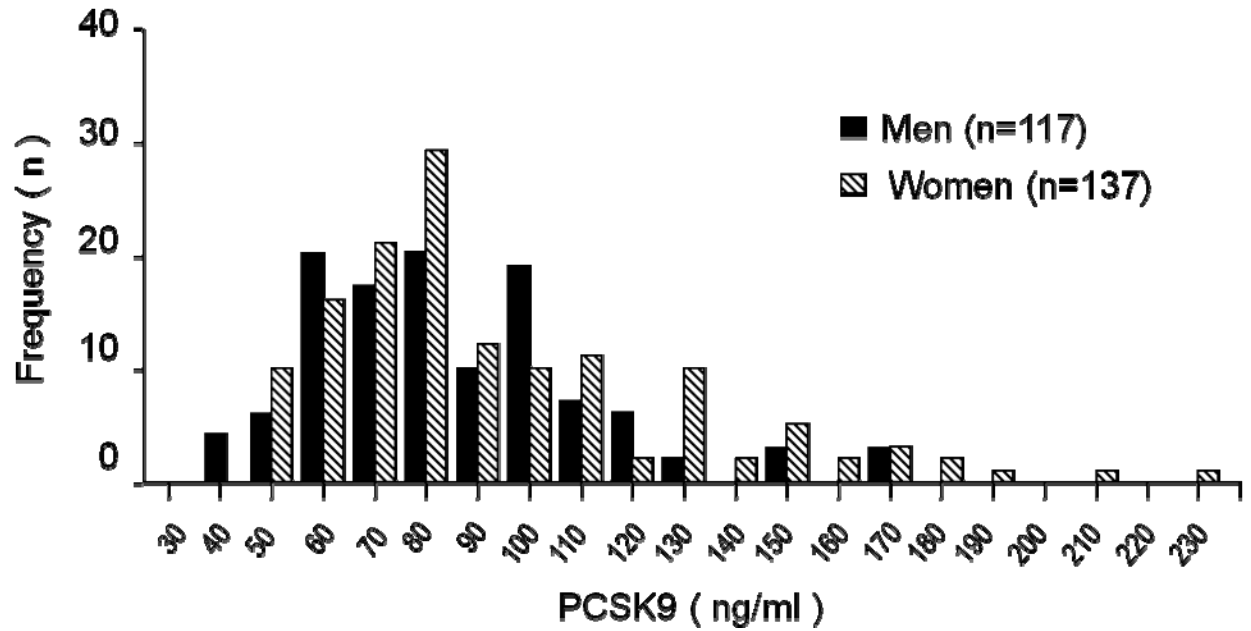


Figure 1. Frequency distribution of plasma PCSK9 in 254 healthy volunteers

Plasma PCSK9 levels were significantly higher in hypercholesterolemic patients without treatment ($n = 59$) than in healthy volunteers ($n = 254$, $p < 0.04$). Statin-treated individuals ($n = 86$) had higher levels than controls ($p < 0.0001$) and those receiving ezetimibe in combination with a statin ($n = 38$) had higher levels than controls ($p < 0.0001$) and statin-treated subjects ($p < 0.003$). In hypercholesterolemic subjects, statins and ezetimibe increased plasma PCSK9 concentration as a function of reduction of plasma LDL-C ($r = 0.447$, $p < 0.001$). In the 4 subjects receiving ezetimibe alone, the PCSK9 levels were near the mean of the control subjects.

In vitro preliminary studies showed that 10 μ M atorvastatin, in contrast to insulin 100 nM used as a negative control, markedly increased PCSK9 protein as compared to vehicle in HepG2 cell lysate after 24-hour incubation as shown by immunoblotting with

specific anti-hPCSK9 antibody (Figure 2A). The Western blot revealed a marked increase in pro-PCSK9 and in the fragment cut by furin.

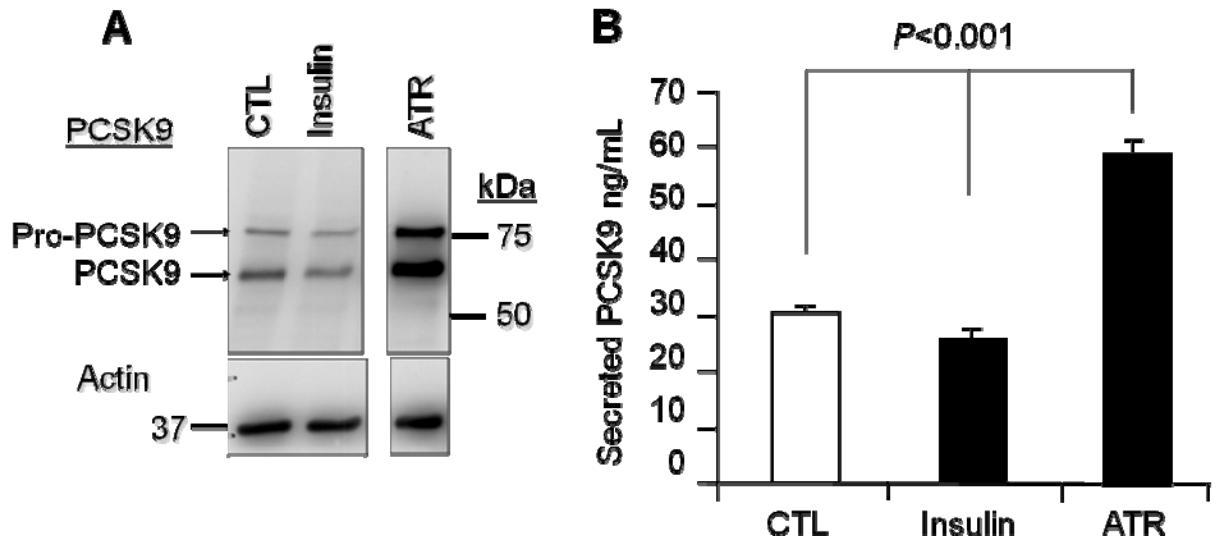


Figure 2. Effect of atorvastatin on PCSK9 *in vitro* in HepG2 cells. **A**. HepG2 cells incubated with vehicle (CTL), 100nM insulin or 10 μ M atorvastatin (ATR) for 24H. Cell lysate analysed by Western blotting. **B**. Secreted PCSK9 from HepG2 cells was analysed by ELISA (triplicate measurements, mean \pm SEM, Student t test).

Similarly a doubling of PCSK9 secreted in the culture medium by HepG2 cells was observed after exposure to atorvastatin but not to insulin ($p < 0.001$, triplicate measurements) (Figure 2B). In contrast after an incubation of 16 hours with vehicle, ezetimibe 25 μ M or ezetimibe 50 μ M, PCSK9 secretion by HepG2 cells or Caco-2 cells measured by ELISA was unaffected by ezetimibe (Figure 3). At the transcriptional level, however, there was a modest increase (~ 1.5 to 2-fold) in mRNA of PCSK9 and of Nieman-Pick C1-like-1 protein (NPC1L1), the target of ezetimibe for inhibiting cholesterol absorption, in HepG2 cells but no significant rise in PCSK9 secretion in Caco-2 cells. Secreted levels of PCSK9 by Caco-2 cells are about one fourth those of HepG2 cells (Figure 4). These are preliminary results and need be repeated.

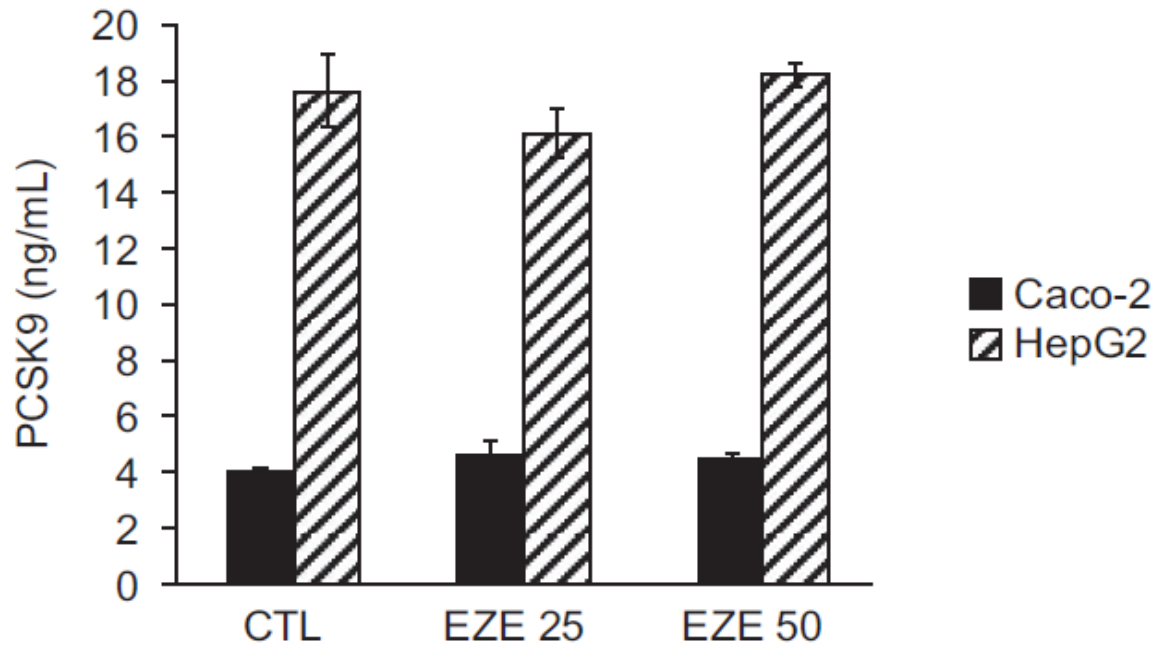


Figure 3. Effect of ezetimibe (EZE) on PCSK9 protein secretion *in vitro* by HepG2 and Caco-2 cells.

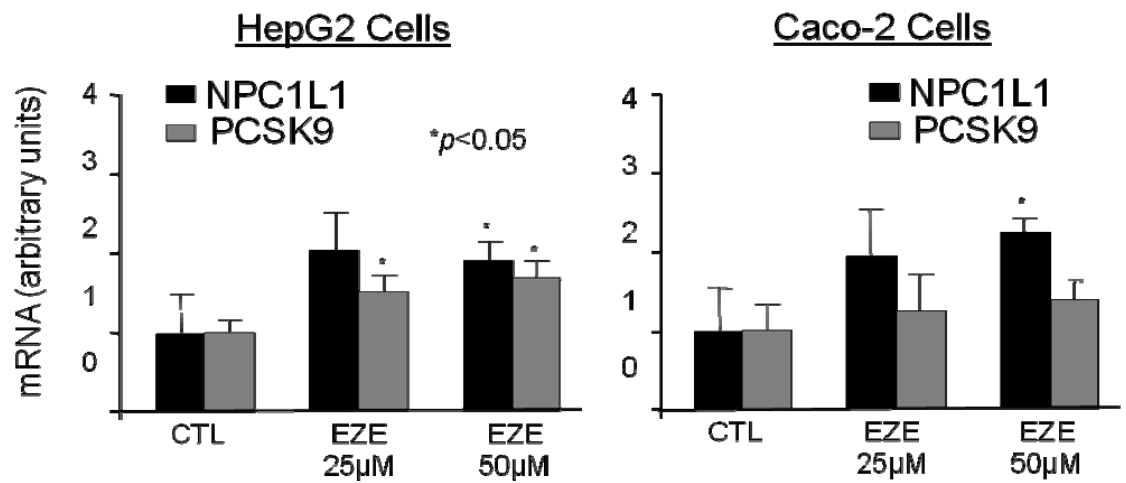


Figure 4. Effect of ezetimibe (EZE) on PCSK9 and NPC1L1 gene expression *in vitro* in HepG2 cells (*left panel*) and Caco-2 cells (*right panel*).

7.2.5. Discussion

In contrast to others that have been published (14–16), our ELISA method measures total plasma PCSK9, including the fragment cut by furin and the pro-segment, released in plasma. This provides a research tool that allows, by immunoblotting, analysis of the relative proportion of mature and degraded PCSK9 and assessment of the metabolic processing of PCSK9 in plasma. In this study, measurement of plasma PCSK9 allowed the establishment of a physiological range to demonstrate the absence of gender effect on levels, distribution and means and to reveal significant positive correlations with LDL-C, triglycerides, glucose, age and BMI but not HDL-C. The significance of these correlations will need to be further explored as there are discordant reports in the literature (15). The method also provides an important means to identify carriers of mutations expressing a new disease entity (i.e. FH-3) or variants that may affect the severity of atherogenic forms of hypercholesterolemia. This is of importance in clinical practice. Mutations of PCSK9 have been shown to modulate the severity of the FH phenotype. For instance, compound heterozygosity for an *LDLR* mutation and for a gain-of-function mutation of *PCSK9* results in clinical and biochemical manifestations that are indistinguishable from those of homozygous FH, whereas heterozygotes for either of the mutations have similar features (17). Conversely, presence of a loss-of-function mutation of *PCSK9* may improve the manifestations of FH secondary to a *LDLR* mutation and even improve response to treatment (18). The finding in this small cohort of patients that 7 subjects had a *PCSK9* variant (one had two of them: A53V plus an extra leucine in position 10) is a case in point, as it might indicate that these variations may be more frequent among French-Canadians because of a founder effect as observed with *LDLR* mutations (13). The loss-of-function mutations add a new cause for hypobetalipoproteinemia (19). Furthermore, there is recent evidence that some of these variants may be associated with increased cardiovascular risk. In the Tempere Coronary Study in Finland, 9 branches of the circle of Willis were scored

for atherosclerosis in 604 subjects at autopsy (20). The G allele of the E670E variant associated with increased cerebral artery stenosis and the risk of stroke.

The fact that statins increase plasma PCSK9 is consistent with our previous demonstration that HMG-CoA reductase inhibitors up-regulate PCSK9. Atorvastatin ability to increase PCSK9 concentrations has been confirmed by another research group (16). The effect of statins is dose-dependent and correlates with the degree of LDL-C reduction. The preliminary *in vitro* study did not reveal an increased secretion of PCSK9 by HepG2 cells, although mRNA levels were increased; one could speculate that the further increase of plasma PCSK9 with addition of ezetimibe is not due to an enhanced secretion but perhaps to a reduced breakdown. This hypothesis should be further tested. Little is known regarding hormonal factors modulating PCSK9 levels, but in the present study there was no difference between women taking oral contraceptives or hormone replacement therapy (n = 26) and those not taking any (n = 111).

Because of its ability to degrade the LDL receptor, since loss-of-function mutations associate with low plasma LDL-C and apoB [LDL-C as low as 15 mg/dl in a homozygous for the C679X mutation in Zimbabwe (21)], and in view of the reported reduction in coronary artery disease mortality, PCSK9 has become a prime target for therapy. Inhibitors are currently being investigated, whether they are specific antisense molecules (22) or use an RNAi silencing approach (23) opening interesting new avenues of research (24).

7.2.6. Acknowledgments

The following contributors to this work are gratefully acknowledged: Michel Tremblay¹, Lucie Boulet¹, Hélène Jacques¹, Lise Bernier¹, Jacques Genest Jr², and Nabil G. Seidah³. ¹Hyperlipidemia and Atherosclerosis Research Group, Clinical Research Institute of Montreal (IRCM), 110 Pine Avenue West, Montreal, QC, Canada, H2W1R7, ²Cardiovascular Genetics Laboratory, Cardiology Division, McGill University Health

Centre/Royal Victoria Hospital, 187 Pine Avenue West, Montreal, Quebec, Canada H3A 1A1; ³ Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal, (IRCM), 110 Pine Avenue West, Montreal, QC, Canada, H2W1R7. G.D. is a recipient of a doctoral award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. This work was funded in part by the first Pfizer Jean Davignon Distinguished Cardiovascular and Metabolic Research Award and by a CIHR grant # 60940 to JD and # MOP 36496 to N.G.S. and a Canada chair # 20652.

7.2.7. References

1. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003;34(2):154–156.
2. Seidah NG, Prat A. The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med* 2007;85(7):685–696.
3. Davignon J, Dufour R. Primary hyperlipidemia -An Atlas of investigation and diagnosis. First ed. Clinical Publishing, 2007.
4. Seidah NG, Mayer G, Zaid A, Rousselet E, Nassoury N, Poirier S et al. The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(6–7):1111–1125.
5. Zaid A, Roubstova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Hamelin J, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* 2008;48(2):646 –654.
6. Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, Cooper RS, Vega GL, Cohen JC et al. A Spectrum of PCSK9 Alleles Contributes to Plasma Levels of Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *Am J Hum Genet* 2006;78(3):410 –422.

7. 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* 2006;354(12):1264–1272.
8. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L et al. Statins upregulate *PCSK9*, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(8):1454–1459.
9. Attie A and Seidah NG. Dual regulation of the LDL receptor -some clarity and new questions. *Cell Metab* 2005;1(5):290–292.
10. Dubuc G, Tremblay M, Paré G, Jacques H, Boulet L, Genest J, Jr. et al. A new method for measurement of total plasma PCSK9: Clinical applications. *J Lipid Res* 2010;51:140-149.
11. Nassoury N, Blasiolo DA, Tebon Oler A, Benjannet S, Hamelin J, Poupon V, et al. The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic* 2007;8(6):718–732.
12. 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* 2006;281(41):30561–30572.
13. Davignon J, Roy M. Familial hypercholesterolemia in French-Canadians: Taking advantage of the presence of a “founder effect”. *Am J Cardiol* 1993;72:6D–10D.
14. Alborn WE, Cao G, Careskey HE, Qian YW, Subramaniam DR, Davies J et al. Serum Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Is Correlated Directly with Serum LDL Cholesterol. *Clin Chem* 2007;53(10):1814–1819.
15. Mayne J, Raymond A, Chaplin A, Cousins M, Kaefer N, Gyamera-Acheampong C et al. Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361(2):451–456.

16. 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* 2008;49(2):394–398.
17. Pisciotta L, Priore OC, Cefalu AB, Noto D, Bellocchio A, Fresa R et al. Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Ath* 2006;186(2):433–440.
18. 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* 2006;26(5):1094–1100.
19. Fasano T, Cefalu AB, Di Leo E, Noto D, Pollaccia D, Bocchi L et al. A novel loss of function mutation of PCSK9 gene in white subjects with low-plasma low-density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(3):677–681.
20. Abboud S, Karhunen PJ, Lutjohann D, Goebeler S, Luoto T, Friedrichs S et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) gene is a risk factor of large-vessel atherosclerosis stroke. *PLoS ONE* 2007;2(10):e1043.
21. Hooper AJ, Marais AD, Tanyanyiwa DM, Burnett JR. The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Ath* 2007;193:445–448.
22. Graham MJ, Lemonidis KM, Whipple CP, Subramaniam A, Monia BP, Crooke ST et al. Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin kexin 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J Lipid Res* 2007;48(7):763–767.
23. Frank-Kamenetsky M, Grefhorst A, Anderson NN, Racie TS, Bramlage B, Akinc A et al. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(33):11915–11920.
24. Seidah NG. PCSK9 as a therapeutic target of dyslipidemia. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(1):19–28.

7.2.8. DISCUSSION

Schonfeld, St. Louis: Could you say something about your reports that combinations of statins and ezetimibe are no more beneficial in coronary disease prevention than statins by themselves?

Davignon, Montreal: I think what's been reported in the press is ludicrous. I think the study on what this is based is really a bad study, where they looked at changes in intimal-medial thickness, and they used FH patients who had been treated with statins to a large extent for a long time; and, in fact, the intimal-medial thickness at the start was normal. They didn't get the results expected, that they might have seen in patients where they would have had an increase in the intimal-medial thickness as we see in untreated familial hypercholesterolemia. That accounted for the good results of their first studies. On the other hand, I always wonder whether the difference could be ascribed to pleiotropic effects of statins not shared by ezetimibe. Statins have pleiotropic effects. They have effects on inflammation and oxidation and coagulation. Without such effects you don't have an early separation of the treatment curves from the control curves. You have a separation that is much later. For example, in the POSCH trial, they used partial ileal bypass to lower cholesterol by 40%. They got a result, but it took seven years before the result became significant. So lowering LDL cholesterol alone without the pleiotropic effects is not as dramatic. So maybe if that study had lasted for more than two or three years, it would have probably been positive from that standpoint alone.

Kelley, Philadelphia: That is certainly a fascinating study and beautiful work. I wondered, as you well know and most of the audience does too—I'm sure all of the audience does—Vytorin or the combination of Zetia and Zocor has gotten a lot of bad press, some bad press recently, particularly related to the question of whether the progression of malignancy might be different when you add Zetia to Zocor. Is there anything in your studies that would help you understand any more of that possibility?

Davignon, Montreal: Well, you have seen also that there was a review of several trials where Zetia was given in combination, and these are the trials where there was no increase in cancer. Furthermore, there are many studies linking the use of statin with a decrease in cancer, and with an increase in cancer; and so I don't have a judgement on that situation at the present time. I don't know what could be the cause of that. There was a paper at one point where they could link the incidence of cancer not so much with the statin effect but with the degree of reduction in LDL cholesterol; but this paper was criticized a lot later on. At the present time, I would say there is so much in favor of statins for the protection against cancer. I am not sure that ezetimibe would make a dent in that, but I don't know; and I don't think we have the answer.

Kelley, Philadelphia: Well some of us also believe it is likely to be artifact, but the one observation that is hard to be sure of at the moment is not the incidence of cancer but the progression of cancer; and that was the reason I asked the question; and it sounds like it is probably not relevant to this new finding and hopefully not relevant to anything.

Calkins, Buffalo: As a rheumatologist I was interested in the hands of the patient that you showed in the corner of one slide. Now is this very, very rare? Tells us about those nodules and are they actually blue in color, those nodules?

Davignon, Montreal: Well this is a young case of familial hypercholesterolemia, homozygous for a known mutation, and it is very severe disease that progressed from birth to about the age of 28 when he died with aortic stenosis and all of the complications of FH. The tumors were much smaller at first, and over the years they became reddish like that. But if you are a rheumatologist, it is interesting to note that many patients who have tendon tumors in FH really respond beautifully to a statin. You know it goes down rapidly. They often complain of inflammation in their tendon which is really paradoxical, and you have to give them some anti-inflammatory agents for a little while. It is self-contained, and it doesn't last long; but it happens, and the other point—I like to talk to rheumatologists—I

don't know if you have seen that paper—I can't remember the author—but they gave atorvastatin to a patient with Still's Disease, you know the idiopathic refractory juvenile arthritis where they really get into a wheelchair by the age of nine. The little fellow had received everything including cyclosporine, prednisone and stem cell infusion and what not and methotrexate and so forth; and then they didn't know what to do. So they gave him atorvastatin, and within three months his CRP went down to normal, his pain decreased tremendously and he was out of his wheelchair. I am saying that because statins, because of their pleiotropic effects, do have potent anti-inflammatory effects and they are active even in this rare disease; but that's an anecdote, and I am sure other tests will be done in this disease.

Palmer, New York: Very interesting work. Is there any relation between patients with hypercholesterolemia with that defect and myalgia related to the statins?

Davignon, Montreal: No. We have not been able to link those to one another, and as a matter of fact, these patients behave, well I don't have many of those cases with a gain of function mutation, and the few I have seen look exactly like a normal FH, and they respond normally. We haven't seen any with myalgia, but there are so few of those, that I can't tell you the answer.

8. Quantification, distribution et association de certains facteurs métaboliques avec le niveau de PCSK9 plasmatique chez l'humain

8.1. Une nouvelle méthode pour la mesure de la PCSK9 plasmatique totale – Applications cliniques

Article #3 :

A new method for measurement of total plasma PCSK9: Clinical applications

Geneviève Dubuc, Michel Tremblay, Guillaume Paré, Hélène Jacques, Josée Hamelin, Suzanne Benjannet, Lucie Boulet, Jacques Genest, Lise Bernier, Nabil G. Seidah, and Jean Davignon.

Publié dans *Journal of Lipid Research*, 2010, volume 51(1), pages 140-149.

L'objectif principal de ce troisième article était de mesurer la concentration plasmatique de la PCSK9 dans une cohorte d'individus sains et chez des patients hypercholestérolémiques à l'aide du développement d'un ELISA spécifique à PCSK9. Geneviève Dubuc, Michel Tremblay et Hélène Jacques ont développé le test ELISA et effectué les dosages. Geneviève Dubuc a recruté les volontaires sains, a compilé tous les résultats des sujets (volontaires et patients) et analysé les résultats. Guillaume Paré a participé à l'analyse des résultats et à la révision du manuscrit. Lucie Boulet a séquencé le gène *PCSK9* chez les sujets sélectionnés. Josée Hamelin et Suzanne Benjannet ont caractérisé la nouvelle mutation identifiée. Dr Jacques Genest a recruté une partie des sujets sains et participé à la révision du manuscrit. Lise Bernier a participé l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit. Nabil G. Seidah et Dr Jean Davignon ont participé à

l'analyse des résultats, à la révision du manuscrit et ont supporté le projet financièrement (Pfizer (JD), IRSC #MOP36496, CTP82946 et chaire canadienne #20652 (NGS), Fonds de la recherche en santé (GD)).

8.1.1. Abstract

The proprotein convertase subtilisin kexin-9 (PCSK9) circulates in plasma as mature and furin-cleaved forms. A polyclonal antibody against human PCSK9 was used to develop an ELISA that measures total plasma PCSK9 rather than only the mature form. A cross-sectional study evaluated plasma levels in normal ($n = 254$) and hypercholesterolemic ($n = 200$) subjects treated or untreated with statins or statin plus ezetimibe. In controls, mean plasma PCSK9 (89.5 ± 31.9 ng/ml) correlated positively with age, total cholesterol, LDL-cholesterol (LDL-C), triglycerides, and fasting glucose. Sequencing *PCSK9* from individuals at the extremes of the normal PCSK9 distribution identified a new loss-of-function R434W variant associated with lower levels of circulating PCSK9 and LDL-C. In hypercholesterolemic subjects, PCSK9 levels were higher than in controls (99.3 ± 31.7 ng/mL, $P < 0.04$) and increased in proportion to the statin dose, combined or not with ezetimibe. In treated patients ($n = 139$), those with familial hypercholesterolemia (FH; due to LDL receptor gene mutations) had higher PCSK9 values than non-FH (147.01 ± 42.5 vs. 127.2 ± 40.8 ng/ml, $P < 0.005$), but LDL-C reduction correlated positively with achieved plasma PCSK9 levels to a similar extent in both subsets ($r = 0.316$, $P < 0.02$ in FH and $r = 0.275$, $P < 0.009$ in non-FH). The detection of circulating PCSK9 in both FH and non-FH subjects means that this assay could be used to monitor response to therapy in a wide range of patients.

8.1.2. Introduction

The familial hypercholesterolemia (FH) phenotype is characterized by elevated plasma LDL-cholesterol (LDL-C) levels, xanthomas, and premature atherosclerosis associated with increased risk of coronary artery disease (CAD). FH is caused primarily by loss-of-function (LOF) mutations in the LDL receptor gene (*LDLR*) responsible for the removal of plasma cholesterol, which is mainly found in LDL particles (1) or in the apolipoprotein B gene (2), the main protein component of LDL. In 2003, Abifadel et al. (3) identified another protein associated with this phenotype, the proprotein convertase subtilisin/kexin-9 (PCSK9) (4).

The human PCSK9 gene (*PCSK9*) located on chromosome 1p32.3 is ~22 kb long and comprises 12 exons encoding a 692 amino acid protein (5). PCSK9 is expressed mainly in the liver, small intestine, and kidney (4) and is thought to accelerate the degradation of hepatic LDLR in endosomes/lysosomes (6) by direct binding to the epidermal growth factor-like repeat A (EGF-A) domain of the LDLR (7,8). PCSK9 overexpression in cell lines and mice has been shown to reduce LDLR levels and increase plasma LDL-C (9–12). Similarly, transgenic overexpression of mouse (13) and human PCSK9 (14) in hepatocytes or human PCSK9 in kidney (15) also results in a dramatic reduction of hepatic LDLR. Furthermore, parabiotic transfer of plasma PCSK9 from human *PCSK9* transgenic mice to wild-type (WT) mice causes a dramatic reduction in hepatic LDLR levels (14). Conversely, inactivation of the mouse *Pcsk9* gene leads to increased LDLR protein and decreased plasma LDL-C (13, 16). During secretion, PCSK9 may be cleaved by a furin-like proprotein convertase(s), curtailing its action on cell surface LDLR (17).

To date, more than 40 amino acid variants of PCSK9 have been shown to affect plasma cholesterol levels in humans (5, 18–20). These changes are classified as gain-of-function (GOF) mutations when they are associated with high levels of LDL-C and as LOF mutations when associated with low LDL-C. GOF mutations result in mild to severe hypercholesterolemia. In the most severe Anglo-Saxon mutation, D374Y, total cholesterol (TC) values reach as high as 13.1 mmol/L (21). The onset of CAD in patients with D374Y may be 10 years sooner than in heterozygous FH patients with severe LDLR mutations (22). On the other hand, a retrospective study has shown a significantly reduced risk of CAD in carriers of PCSK9 LOF variants R46L (partial LOF) and Y142× or C679× (complete LOF). Together, the latter two nonsense mutations were associated with a 28% reduction of plasma LDL-C and an 88% reduction in the frequency of coronary events (23). While that study supported the cardioprotective role of long-term reduction of cholesterol levels, a direct protective effect of reduced PCSK9 was not excluded. Furthermore, a compound heterozygote for two inactivating mutations (Y142× and ΔR97) in PCSK9 had a

strikingly low plasma level of LDL-C (0.36 mmol/L) and no immunodetectable circulating PCSK9 (18). Another individual homozygous for the C679 \times mutation had a plasma LDL-C of 0.41 mmol/L (24). All these findings support the hypothesis that levels and/or higher activity of plasma PCSK9 modulate the levels of LDL-C and TC, suggesting that long-term lowering of PCSK9 might be beneficial in reducing the incidence of CAD (25).

PCSK9, like the LDLR, is regulated by sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2), a transcription factor involved in activation of many genes implicated in cholesterol metabolism (26, 27). This finding is supported by our previous work, in which we showed that in HepG2 cells (a human hepatoma cell line) and human primary hepatocytes, PCSK9 mRNA levels were increased by statins, likely via SREBP-2 (28). Preliminary data on the response of PCSK9 to cholesterol-lowering therapy revealed that statins and fibrates can significantly modify plasma PCSK9 levels (29–31).

In the present study, we measured plasma PCSK9 by ELISA in 254 volunteers and 200 hypercholesterolemic patients. We demonstrated that plasma PCSK9 levels are correlated significantly with age and with levels of TC, LDL-C, triglycerides (TG), and fasting glucose.

Moreover, we show that PCSK9 levels are markedly higher in hypercholesterolemic patients than in controls and higher still in patients receiving cholesterol-lowering therapy. Finally, we identified a novel LOF R434W mutant exhibiting lower plasma levels of LDL-C and PCSK9. The mechanism behind such observations is shown to be related to a 3-fold lower secretion rate of PCSK9-R434W from cells and ~70% LOF on its effect on cell surface LDLR.

8.1.3. Methods

Production and purification of anti-PCSK9 antibodies

Recombinant truncated human PCSK9 (PCSK9; Met-amino acids 31–454) was produced in bacteria and purified as described (6). It was injected into two rabbits by a standard protocol to generate a polyclonal antibody to human PCSK9 (hPCSK9-Ab). The antibodies were first prepurified by precipitation with ammonium sulfate (50% final concentration). After solubilization and dialysis of the precipitate, the antibodies were purified by affinity chromatography using a CNBr-activated Sepharose 4B column (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) coupled with the purified antigen (PCSK9). A fraction of this purified antibody was conjugated with horseradish peroxidase (hPCSK9-Ab-HRP) using the EZ-Link™ Plus Activated Peroxidase protocol from Pierce (Rockford, IL). Finally, the conjugated antibody was purified from excess free HRP using the FreeZyme Conjugate Purification kit (Pierce prod no. 44920).

Immunoprecipitation and immunoblotting

Immunoprecipitations were carried out as previously described (17) using the hPCSK9-Ab and activated agarose beads coupled with goat anti-rabbit IgG (Trueblot™ eBioscience, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. Immunoprecipitated proteins were separated on 4–20% gradient acrylamide gels and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P™, Millipore, Billerica, MA). For immunoblotting, hPCSK9-Ab-HRP was used at a dilution of 1:500. The blots were revealed by chemiluminescence with Pierce SuperSignal™ West Dura on Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare Limited, UK). HepG2 and HuH7 cells were cultured as previously described (17, 28).

Subjects, sample handling, and sequencing

Blood was collected into EDTA-Vacutainer™ tubes after a 12 h fast. Samples were taken from 254 healthy volunteers over 18 years of age who were not taking any

medication for hyperlipidemia, hypertension, or diabetes, and from 200 hyperlipidemic patients attending our lipid clinic. Plasma and blood leukocytes were obtained by centrifugation at 3,000 rpm for 15 min at 4°C. Total and lipoprotein cholesterol and TGs were quantitated at the laboratory of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal using a standard enzymatic method on a Bayer Advia multi-analyzer. LDL-C was calculated using the Friedewald equation, except if TG were ≥ 4.5 mmol/L ($n = 6$) (32). All subjects gave informed written consent and the Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM) ethics committee approved this protocol. DNA was extracted from white blood cells using QIAmp Blood Maxi kit (Qiagen, Mississauga, ON) according to the manufacturer's instructions. The sequences of the primers used for amplifying all 12 exons were obtained from NCBI at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/> using the resequencing amplicons for PCSK9. The amplified fragments were purified from agarose gels using QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Mississauga, ON) and sequenced on a 3130 XL Genetic analyzer from ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA) using M13 sequencing primers. Sequences were analyzed with SequencherTM software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

ELISA assay

LumiNunc Maxisorp white assay plates (Nunc, Denmark) were coated with 0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ of hPCSK9-Ab by incubation at 37°C for 3 h in PBS (NaPO₄ 10 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.4) containing Na azide (1 g/L) then stored at 4°C. The plates were washed six times before use with PBS containing Tween 20 (0.5 ml/L) and then incubated for 1 h at room temperature with blocking buffer (PBS, casein 0.1%, merthiolate 0.01%). Calibrators were prepared using serial dilutions of 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 plate addition (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 was added for 3 h at 37°C with shaking. Finally, after washing, 100 μl of substrate (SuperSignalTM

ELISA Femto Substrate, Pierce) was applied to each well. Chemiluminescence was quantitated on a Pherastar luminometer (BMG Labtech). A standard curve was established using a conditioned medium containing recombinant human PCSK9 as described previously (33). This standard medium was calibrated by comparison to a full-length secreted and purified PCSK9 from a Baculovirus system in *HiFive* cells (kind gift from Rex Parker, Bristol-Myers Squibb). The peptide purity and concentration were determined by quantitative amino acid analysis following 18–24 h hydrolysis in the presence of 5.7 N HCl in vacuo at 110°C on a Beckman autoanalyzer (model 6300) with a postcolumn 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. It was measured on frozen plasma samples.

Statistical analysis

Spearman correlation coefficients (r) were used to assess the relationship between variables. Data were analyzed with GraphPad Prism software and significance defined as $P < 0.05$ (two-sided). Stepwise regression analysis was performed by the statistical department of the Université de Montréal using SPSS software, version 15. ANOVA was used to determine drug dosage effect on PCSK9 levels. No correlations were performed in patients who had $TG \geq 4.5$ mmol/L.

Functional analysis of the novel natural mutant R434W

HEK293 cells were transiently transfected with pIRES-cDNAs coding for WT PCSK9, or the novel variant R434W, tagged at the C-terminus with a V5-antigen (4). Forty-eight hours posttransfection, the cells were pulsed for 4 h with ^{35}S -(Cys+Met). Cell lysates and media were then immunoprecipitated with a V5 mAb and the precipitates separated by SDS-PAGE (8%) and analyzed by autoradiography, as reported (4, 10). To define the ability of the R434W mutant to degrade LDLR, 24 h spent media were prepared from HEK293 cells transiently transfected with each construct. An ELISA assay of the

media defined the amount of PCSK9 secreted for each construct. The media were then incubated with HuH7 cells for 1 h or overnight and the cells were washed, detached in 0.5 mM EDTA (Versene, Gibco), and subjected to fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis using an LDLR-specific monoclonal antibody (C-7 mAb, 1:100 dilution, Santa-Cruz, CA), thus quantitating the levels of cell-surface LDLR.

8.1.4. Results

Anti-PCSK9 antibody recognizes both mature and furin-cleaved PCSK9 in human plasma

Using affinity-purified hPCSK9-Ab, Western blot analysis of human PCSK9 in the culture media of HEK293 cells overexpressing hPCSK9 revealed the mature (~60 kDa) and furin-cleaved PCSK9 (PCSK9- ΔN_{218} ; ~53 kDa) forms (17), none of which were observed in control cells expressing an empty pIRES vector. Similar immunoreactive PCSK9 forms are also observed in the plasma of three different individuals (Fig. 1).

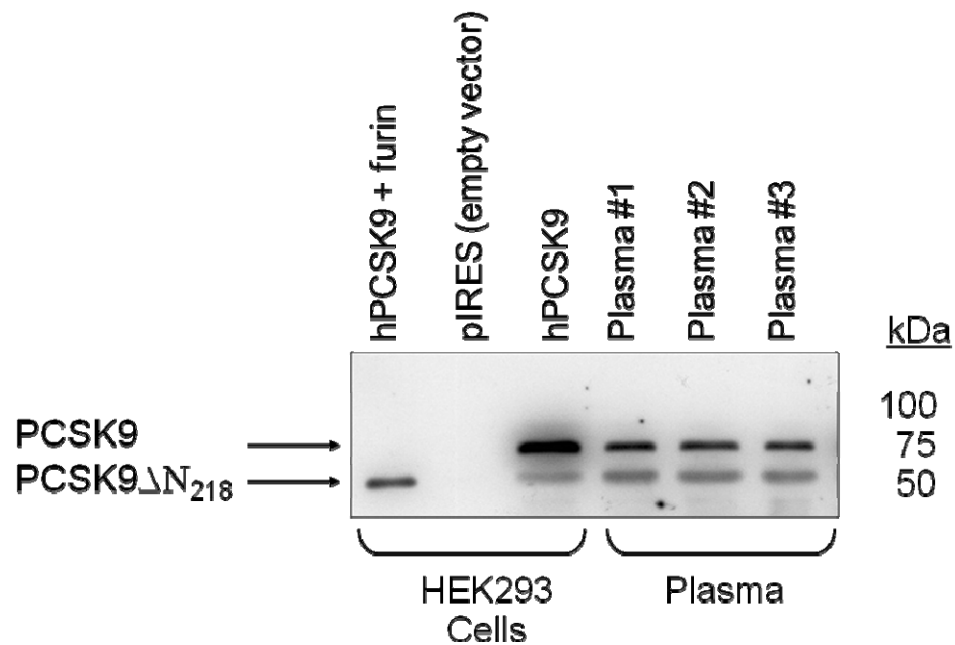


Fig. 1. Specificity of hPCSK9-Ab for native PCSK9 in culture medium and plasma. Immunoprecipitation was carried out with polyclonal hPCSK9-Ab against culture media of HEK293 cells respectively transfected with vector alone (pIRES), PCSK9, PCSK9 and furin, and against plasma from three different individuals. Immunoprecipitates were separated by a 4–20% polyacrylamide gradient SDS-PAGE, transferred to a polyvinylidene difluoride membrane, and revealed with hPCSK9-Ab-HRP. PCSK9- Δ N₂₁₈ represents PCSK9 cleaved by furin (17).

Validation of the ELISA to measure PCSK9 in human plasma

We designed an ELISA to measure circulating levels of PCSK9 in human plasma samples using an affinity-purified hPCSK9-Ab polyclonal antibody. Part of this antibody was conjugated to HRP and excess HRP was removed by affinity chromatography. A linear standard curve was established with culture media and serial 1:2 dilutions of the media of HEK293 cells overexpressing recombinant human PCSK9 ($r^2 = 0.997$). This culture medium was calibrated with respect to purified PCSK9 characterized by quantitative amino acid analysis. Intra- and inter-assay variation coefficients of plasma samples were 1.6% (n = 33) and 7.5% (n = 48), respectively. A spike and recovery assessment was performed in two different plasma samples containing very low endogenous PCSK9. Five different quantities of recombinant PCSK9 (1–10 ng) were added to plasma and mean recoveries were 90, 88, 88, 94, and 98%, respectively. A plasma sample having a high PCSK9 concentration presented a 10% variation within a dilution range of 1:20 to 1:80. Three different plasma samples were subjected to three freeze-thaw cycles (-80°C to room temperature) and their PCSK9 concentration varied by ~3%, which is within the variability range of the assay. Interestingly, no detectable immunoreactive PCSK9 was present in urine or saliva.

Table 1. Clinical characteristics, fasting plasma lipids and PCSK9 levels of 254 healthy volunteers. (Mean \pm SD)

	All subjects (min-max) n=254	Men (min-max) n=117	Women (min-max) n=137
Age (years)	42 \pm 13 (20-77)	41 \pm 13 (20-77)	43 \pm 12 (21-69)
BMI (kg/m ²)	24.5 \pm 4.3 (16.2-41.6)	25.6 \pm 4.0 (17.6-38.8)	23.4 \pm 4.4 (16.2-41.6)
PCSK9 (ng/ml)	89.5 \pm 31.9 (35.3-225.2)	85.3 \pm 26.9 (35.3-172.1)	93.1 \pm 35.4 (47.4-225.2)
TC (mmol/L)	4.86 \pm 0.90 (2.83-7.30)	4.90 \pm 0.89 (3.11-7.05)	4.83 \pm 0.91 (2.83-7.30)
TG (mmol/L)	1.17 \pm 0.62 (0.34-4.30)	1.22 \pm 0.64 (0.45-4.30)	1.12 \pm 0.59 (0.34-3.86)
LDL-C (mmol/L)	2.84 \pm 0.80 (1.17-4.72)	3.01 \pm 0.80 (1.17-4.72)	2.69 \pm 0.78 (1.36-4.59)
HDL-C (mmol/L)	1.50 \pm 0.38 (0.80-2.60)	1.33 \pm 0.32 (0.80-2.36)	1.64 \pm 0.36 (0.83-2.60)
TC/HDL-C	3.44 \pm 1.02 (1.70-6.79)	3.85 \pm 1.03 (2.00-6.79)	3.08 \pm 0.88 (1.70-6.19)
Glucose (mmol/L)	4.84 \pm 0.61 (3.60-6.70)	4.89 \pm 0.63 (3.60-6.70)	4.79 \pm 0.58 (3.60-6.70)

ELISA assay of PCSK9: identification of a novel R434W LOF variant

We collected plasma from 254 healthy volunteers, 117 males and 137 females. Clinical characteristics, fasting plasma lipids, and PCSK9 levels are shown in Table 1. There was no significant difference in plasma PCSK9 levels or in any other variables measured between men and women in this sample (Mann Whitney U test). Distribution of plasma PCSK9 levels measured by ELISA was skewed toward higher values in both men and women (supplementary Fig. I). The mean concentration was 89 ± 32 ng/ml (range, 35–225 ng/ml), and it did not differ significantly between men and women (85 ± 27 ng/ml and 93 ± 35 ng/ml, respectively) (Fig. 1). Combining both genders, we sequenced *PCSK9* in subjects whose plasma values were at the extreme of the frequency distribution, i.e., values < 60 ng/ml or > 150 ng/ml (Fig. 2). This revealed that 5/37 persons exhibiting low PCSK9

levels also showed either a known hypocholesterolemic variation/polymorphism [R46L (3, 19) and double A53V + L10 (19, 34)] or a new, previously unreported variant R434W with no other mutations in the sequence (Fig. 2).

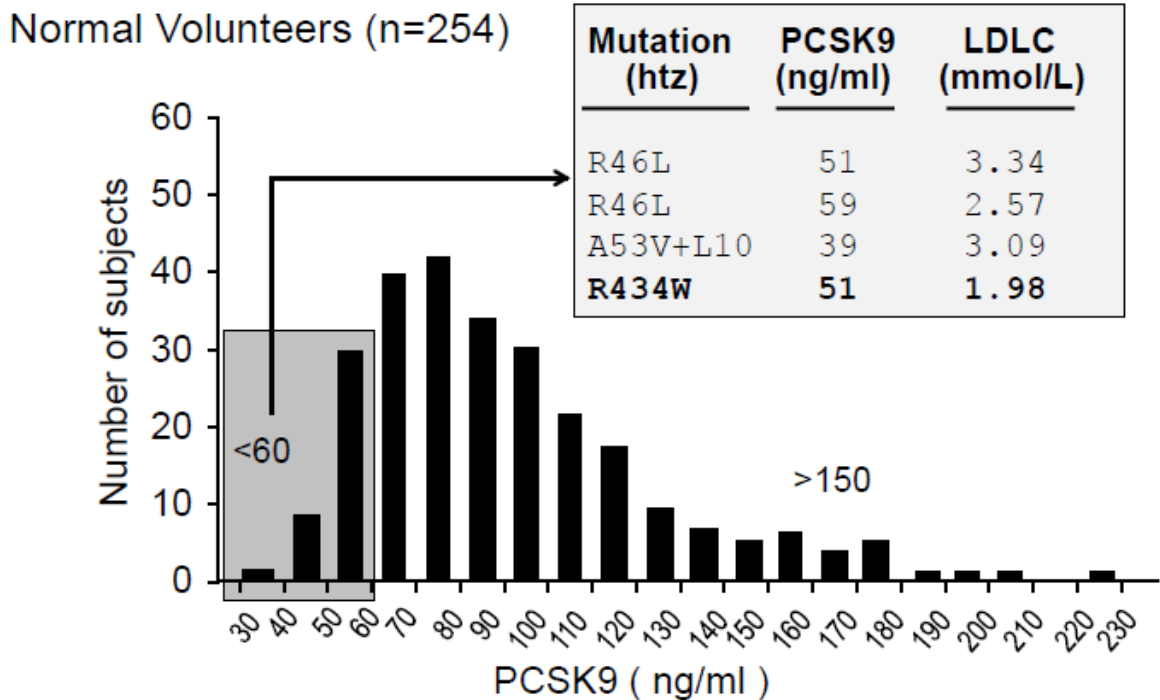


Fig. 2. Sequencing *PCSK9* in individuals from extremes of distribution of plasma levels revealed a novel R434W mutation. The cohort consisted of 117 males and 137 females ranging from 20 to 77 years of age. Plasma was diluted 1:20 and PCSK9 measured by sandwich ELISA as described. DNA from subjects exhibiting low (<60 ng/ml) and high (>150 ng/ml) PCSK9 plasma levels was subjected to exon sequencing. The new mutation R434W is emphasized in bold.

Biosynthetic analysis using a 4 h pulse with ^{35}S -[Met+Cys] of HEK293 cells overexpressing the R434W mutant or the WT sequence revealed that the autocatalytic zymogen cleavage of proPCSK9 to PCSK9 is slightly reduced and the PCSK9 secretion was lower in the R434W mutant (Fig. 3A). Calculations revealed an ~2.5-fold lower level of PCSK9 in the 4 h medium. These data were further confirmed by ELISA assays, which

showed at steady state a 3-fold lower level of secreted PCSK9-R434W (0.60 $\mu\text{g/ml}$) compared with the WT protein (1.82 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. 3B). To compare the ability of PCSK9 to that of the R434W variant to degrade LDLR, we incubated overnight human hepatic HuH7 cells with either equivalent amounts of immunoreactive PCSK9 resulting from spent media of HEK293 cells overexpressing these constructs or 3-fold higher levels of the WT protein. The cells were then detached in EDTA and the media analyzed by Western blot (Fig. 3B), whereas the cells were immediately subjected to FACS analysis to estimate the levels of cell surface LDLR remaining after the incubation (Fig. 3C). The results showed that after 1 h (not shown) or overnight incubation (Fig. 3B) the levels of cell-associated PCSK9-R434W were \sim 2-fold higher than those of the WT protein and that the furin cleavage that occurs during the overnight incubation was \sim 3-fold lower with the R434W variant. These data suggest that this mutation must have a profound influence on the conformation of PCSK9, because it partially delays the zymogen cleavage of proPCSK9 into PCSK9, the secretion of the latter, and the furin processing. Furthermore, the lower level of secreted PCSK9-R434W mutant with a minimal effect on its intracellular levels suggests that a fraction of this mutant protein is rapidly degraded in the cell. As a quantitative measure of the level of cell surface LDLR, FACS analysis of HuH7 cells revealed that compared with WT PCSK9, the R434W variant had \sim 30% of the LDLR-lowering activity, suggesting a partial LOF (Fig. 3C). Thus, the heterozygote variant PCSK9-R434W results in \sim 2-fold lower circulating levels of PCSK9 (Fig. 2), rationalized by a \sim 3-fold lower secretion rate of the protein (Fig. 3B) and a \sim 40% lower LDL-C (Fig. 2) likely related to its LOF on LDLR degradation (Fig. 3C).

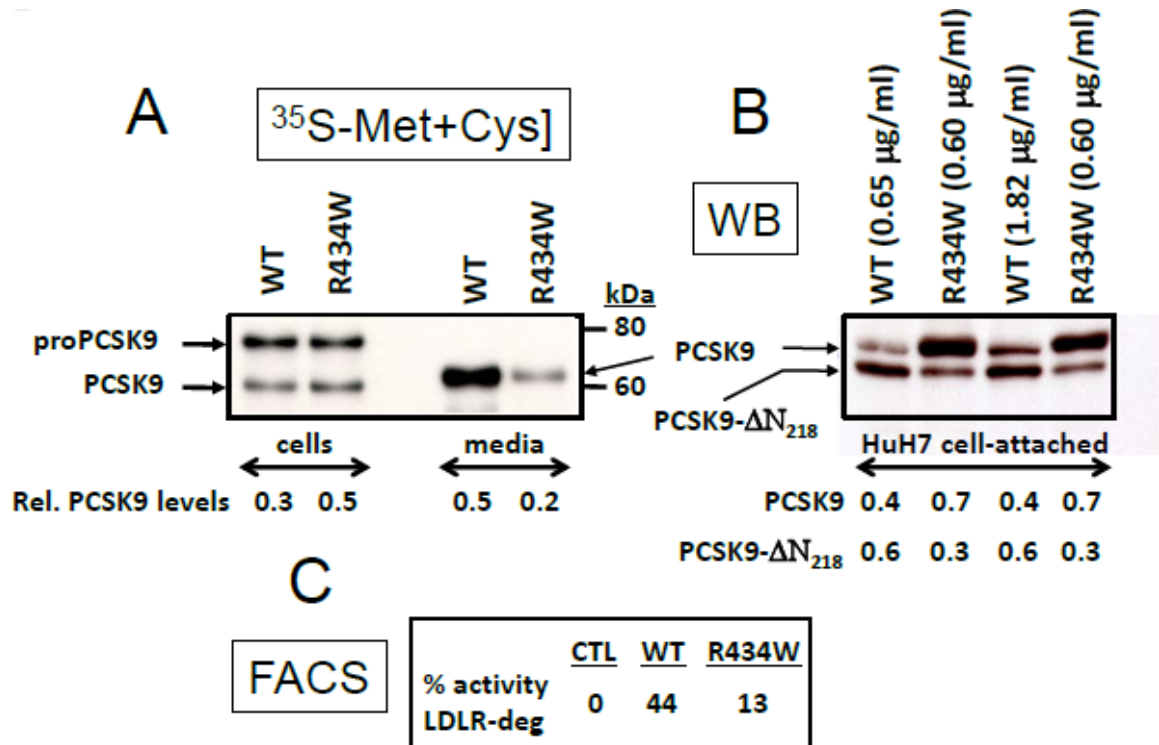
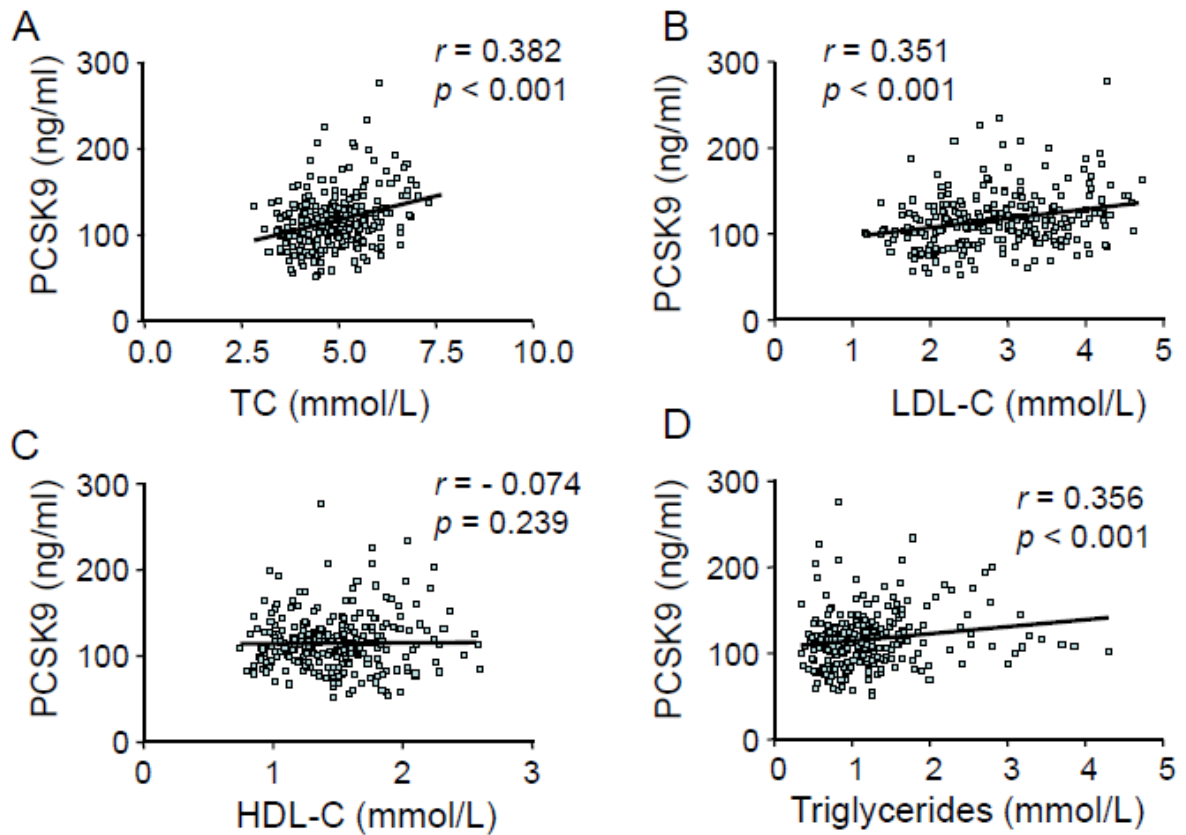


Fig. 3. Functional analysis of the PCSK9-R434W variant. (A) HEK293 cells transiently transfected with cDNAs coding for either the V5-tagged PCSK9 (WT) or its R434W variant were pulse labeled with ^{35}S -[Met+Cys] for 4 h and the cell extract and media immunoprecipitated with a V5-mAb and the precipitate separated by 8% SDS-PAGE in 3% Tricine. Autoradiography allowed the identification of the various forms of PCSK9 and image analysis allowed the quantification of the relative amounts of mature PCSK9 in cells and media versus the total levels (17). (B) Spent media from HEK293 cells containing either 0.65 or 1.82 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PCSK9 or 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PCSK9-R434W were incubated overnight with naïve HuH7 cells. Following washes, the cells were then detached by EDTA and analyzed by Western blot (WB) using the V5-mAb. Notice that the R434W variant is somewhat resistant to furin cleavage, as evidenced by the lower levels of the PCSK9- ΔN_{218} form. The relative quantitation of the two forms is presented at the bottom of Figure 3B. (C) The detached HuH7 cells were also analyzed by FACS using a C-7 mAb directed against the LDLR. The levels of the remaining cell-surface LDLR are then expressed as

compared with cells incubated with media of HEK293 cells transfected with an empty vector.

Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol

Statistical analysis showed significant correlations between PCSK9 levels and TC ($r = 0.382$, $P < 0.001$), LDL-C ($r = 0.351$, $P < 0.001$), TG ($r = 0.356$, $P < 0.001$), fasting glucose ($r = 0.354$, $P < 0.001$), age ($r = 0.376$, $P < 0.001$), and body mass index (BMI) ($r = 0.264$, $P < 0.001$) (Fig. 4). No significant correlation was observed between PCSK9 levels and HDL-cholesterol (HDL-C) ($r = -0.074$, $P = 0.239$). Hormone treatment such as oral contraceptives ($n = 19$) or hormone replacement therapy ($n = 7$) had no detectable effect on plasma PCSK9 levels (not shown).



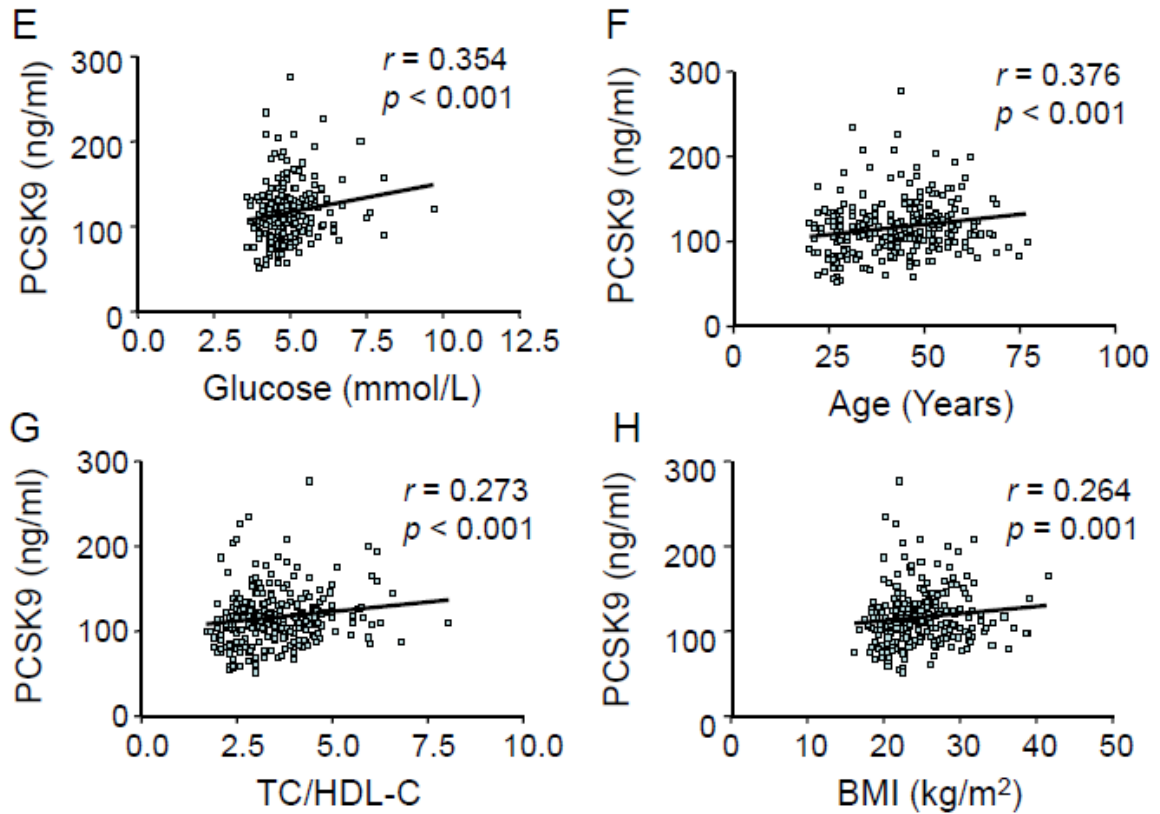


Fig. 4. Relationship between plasma PCSK9 and (A) TC, (B) LDL-C, (C) HDL-C, (D) TG, (E) fasting glucose, (F) age, (G) TC/HDL-C ratio and (H) BMI. r and P were determined using GraphPad Prism software.

Stepwise regression: a model to predict PCSK9 value

Because many of the parameters studied are colinear, such as TC, LDL-C, and HDL-C, we performed a multiple stepwise regression using SPSS software. This stepwise regression selects variables to include in a regression model for the purpose of identifying an optimal subset of predictors. The best model to predict PCSK9 levels showed that TC ($\beta = 8.84$), fasting glucose ($\beta = 11.58$), TG ($\beta = 9.19$), gender ($\beta = -10.14$ for men), and age ($\beta = 0.18$) were parameters that had a significant influence on PCSK9 levels in this multiple regression model. This model explains ~27% of the PCSK9 variability among individuals in our sample.

Statins and ezetimibe upregulate plasma PCSK9

We measured plasma PCSK9 in 200 patients attending the lipid clinic at the IRCM, a tertiary care lipidology reference center. Fifty-nine patients were not on medication, 98 were on statin treatment (55 on atorvastatin, 27 on rosuvastatin, 14 on simvastatin, and 2 on pravastatin), 39 were on a statin-ezetimibe combination, and 4 were on ezetimibe treatment only. All patients had been treated for at least 3 months. There was no significant difference in the correlation between PCSK9 and LDL-C changes according to statin type, nor was there a gender difference in the relationship between PCSK9 and the reduction in LDL-C. However, a significant correlation between plasma PCSK9 and the percent reduction of LDL-C from baseline (before drug treatment) was observed ($r = 0.341$, $P < 0.0001$) (Fig. 5). A positive correlation between PCSK9 plasma levels and change in LDL-C was also seen when we looked at each statin separately ($r = 0.21$, 0.28 , and 0.4 for atorvastatin, rosuvastatin, and simvastatin, respectively) (*not shown*). For the two statins (atorvastatin and rosuvastatin) for which we had a sufficient number of patients, we observed a significant increase in PCSK9 with increasing statin dose in the absence of ezetimibe. When atorvastatin was increased from 5 to 80 mg, plasma PCSK9 levels increased from 109 ± 33 to 142 ± 35 ng/ml ($n = 53$, P for trend = 0.0001 by ANOVA) and for rosuvastatin from 5 to 40 mg, plasma PCSK9 increased from 123 ± 23 to 168 ± 84 ng/ml ($n = 28$, P for trend = 0.0001 by ANOVA). In treated patients ($n = 139$) FH ($n = 51$) subjects had higher PCSK9 values than non-FH ($n = 88$, 147 ± 42 vs. 127 ± 41 ng/ml, $P < 0.005$). However, plasma PCSK9 levels and LDL-C reduction correlated positively to a similar extent in both subsets ($r = 0.316$, $P < 0.02$ in FH and $r = 0.275$, $P < 0.009$ in non-FH). These data support the hypothesis that treatments with statins, or a statin combined with ezetimibe, are significantly associated with an increase in circulating levels of PCSK9.

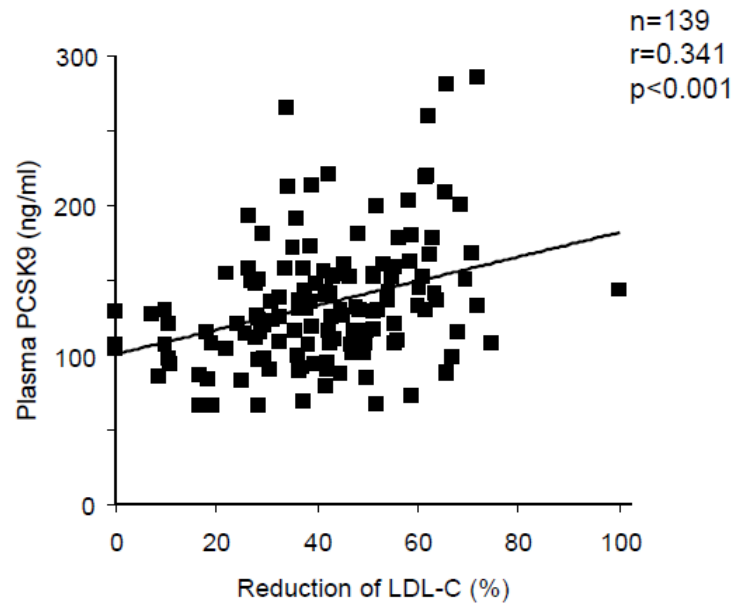


Fig. 5. Statins and ezetimibe are associated with high levels of human plasma PCSK9 as a function of LDL-C reduction. Plasma PCSK9 levels of 139 hypercholesterolemic subjects were measured by ELISA as described. Hypercholesterolemic patients were being treated with one of the following: statins, ezetimibe, or a combination of both. The percent reduction in LDL-C was then plotted against PCSK9 levels (ng/ml). r and P were determined with GraphPad Prism software.

Effects of hypercholesterolemia, statins, and statin-ezetimibe combination on plasma PCSK9 levels

We next stratified patients according to their LDL-C state and/or drug regimen. Thus, we compared the mean plasma PCSK9 levels of 254 healthy controls, 59 hypercholesterolemic patients without medication, 98 patients on statin treatment, and 39 on a statin-ezetimibe combination treatment. We first observed significantly higher plasma PCSK9 levels ($\sim 11\%$, $P < 0.04$) in hyperlipidemic patients compared with controls. Furthermore, patients on statin treatment presented a $\sim 45\%$ ($P < 0.001$) higher plasma PCSK9, whereas those on a combined statin-ezetimibe treatment showed $\sim 77\%$ ($P < 0.001$) higher levels (Fig. 6). We also observed that combined treatment was associated with $\sim 22\%$

higher mean plasma PCSK9 levels when compared with equivalent doses of statin treatment alone ($P = 0.001$). We concluded that hyperlipidemia is associated with higher levels of PCSK9 than those observed in controls and that patients on treatments to lower LDL-C levels exhibited even higher plasma PCSK9 levels. In view of the upregulation of LDL-C by PCSK9, this could potentially result in an otherwise dampened response to these treatments.

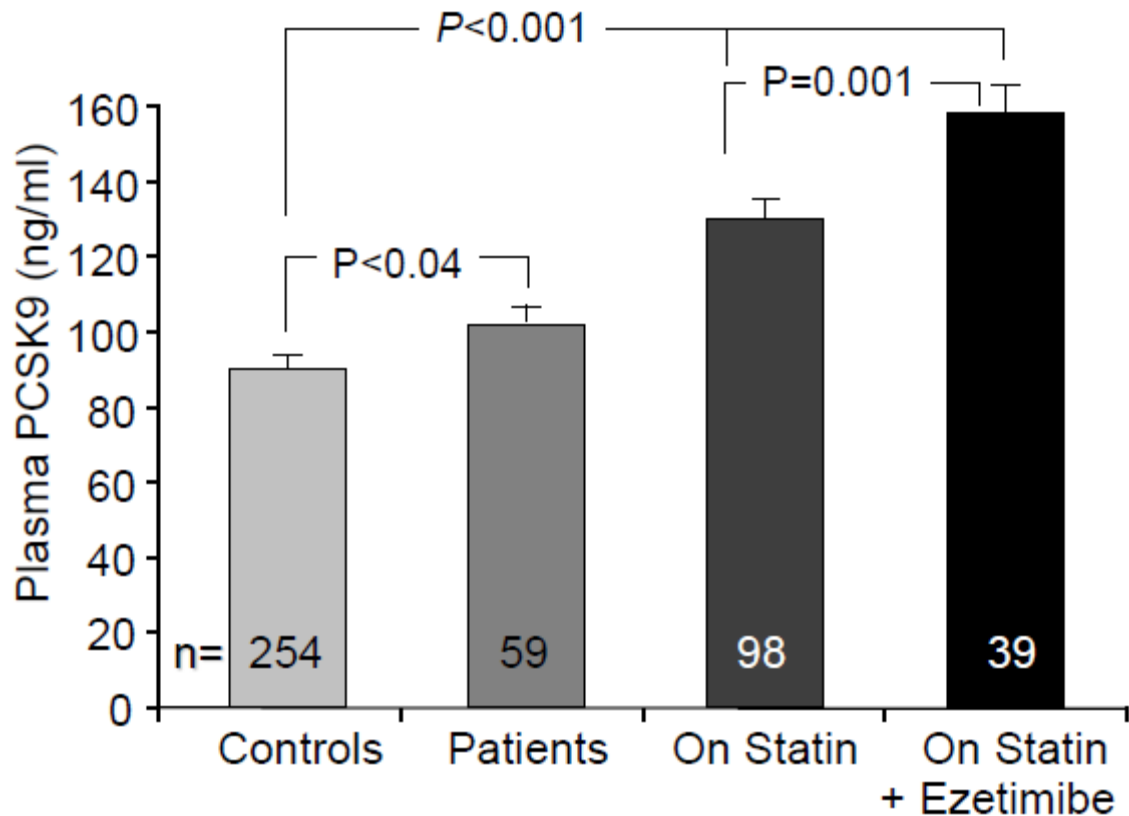


Fig. 6. Relationship of hypercholesterolemia, statins, and statin-ezetimibe combination with plasma PCSK9. Mean \pm SEM. Significance was determined by Student's *t*-test.

8.1.5. Discussion

PCSK9 is now recognized as an important contributor in cholesterol homeostasis and has become a promising target for cholesterol-lowering therapy and CAD prevention

(25, 35, 36). Herein, we report a new sandwich ELISA to measure human plasma PCSK9 concentrations using a polyclonal antibody. With this method, plasma PCSK9 levels in a healthy sample of population average ~ 90 ng/ml (ranging from 35.3 to 225.2 ng/ml) (Fig. 2) and are significantly correlated with both TC and LDL-C levels (Fig. 4A, B).

The significant correlation with TGs, though intriguing, agrees with a very recent report on a large multiethnic cohort analysis of plasma PCSK9 (37). With respect to glucose, it seems that factors that contribute to insulin resistance such as TGs and BMI are associated with higher circulating levels PCSK9 (37). Furthermore, it was also recently reported that in mice, PCSK9 deficiency reduces postprandial triglyceridemia and enhances the hepatic clearance rate of chylomicrons (38). The underlying mechanism(s) requires more extensive studies. Three other groups also developed ELISAs for PCSK9 using different approaches, species, and/or antigens to produce the polyclonal antibodies (14, 30, 39). One report presented a mean value of ~ 200 ng/ml in plasma with a range of 50–600 ng/ml (14), another, a range of 11–115 ng/ml in serum (no mean value given) (39), and the third, a mean value of ~ 4 μ g/ml and a range of 0.1–9.3 μ g/ml (30). Using a different method involving immunoprecipitation, immunoblotting, and densitometry, Mayne et al. (40) obtained a mean concentration of plasma PCSK9 of 6.1 μ g/ml, which is about 50 times the value found in this study, but similar to that reported by Lambert et al. (30). The differences are likely due to sample, methodology, antibody specificities, and the standard used for the absolute quantitation of PCSK9. We used purified full-length human PCSK9 as our reference standard; this was confirmed by amino acid sequence analysis and mass spectrometry and quantitated by amino acid composition of a known weighed sample. Only our assay recognizes both active and furin-inactivated forms of PCSK9 (Fig. 1), offering the potential to measure the ratio of both forms in relation to drug effects and in response to physiological modulators.

While Mayne et al. (40) found significant correlations between PCSK9 and cholesterol levels in men only within a cohort of 182 individuals, we did not confirm this

finding in our cohort of 254 individuals, because we found a significant correlation with cholesterol levels in both men ($P < 0.001$) and women ($P < 0.001$) (Table 2). This difference may be in part related to the age of the population sampled [mean age of 53 (40) or 42 in the present study]. However, in a much larger cohort comprising 3,138 individuals, Lakoski et al. (37) reported that circulating PCSK9 levels are slightly higher in premenopausal women than in postmenopausal women and that it is ~15% higher in women versus men. Given the physiological role of PCSK9 in degrading LDLR, the observed correlation with LDL-C was expected. Cholesterol metabolism is profoundly modified during aging, and LDL-C increases by ~40% from 20 to 60 years of age (41). Other physiological changes occur with age, such as reduced physical activity, redistribution of body fat with a relative increase in visceral adipose mass, decreased insulin sensitivity, and increased blood pressure. Thus, a correlation between PCSK9 and age may explain, in part, correlations with other parameters modulated by age.

Table 2. Relationship between plasma PCSK9 and individual variables in men and women.

	All subjects (n=254)		Men (n=117)		Women (n=137)	
	r	p	r	p	r	p
Age (years)	0.376	<0.001	0.276	0.003	0.448	<0.001
BMI (kg/m ²)	0.264	<0.001	0.280	0.002	0.347	<0.001
TC (mmol/L)	0.382	<0.001	0.404	<0.001	0.381	<0.001
TG (mmol/L)	0.356	<0.001	0.304	<0.001	0.411	<0.001
LDL-C (mmol/L)	0.351	<0.001	0.370	<0.001	0.372	<0.001
HDL-C (mmol/L)	-0.074	0.239	-0.037	0.691	-0.174	0.042
TC/HDL-C	0.273	<0.001	0.303	<0.001	0.422	<0.001
Glucose (mmol/L)	0.354	<0.001	0.230	0.013	0.466	<0.001

This study first demonstrated that measurements of plasma PCSK9 levels can help in the identification of novel PCSK9 variants using our strategy. Indeed, we identified a

new variant, R434W (Fig. 2). Biosynthetic analysis of this variant revealed that it results in a slightly reduced zymogen activation of proPCSK9, a lower secretion rate by ~50%, and a ~70% lower activity of the PCSK9-enhanced degradation of LDLR in HuH7 cells (Fig. 3). The ~3-fold lower secretion rate observed in HEK293 cells (Fig. 3A, B) correlate with the ~50% lower levels of circulating PCSK9-R434W in this heterozygote subject, which is 51 ng/ml versus the mean value of 89 ± 32 ng/ml in normal subjects (Fig. 2). The LOF of the PCSK9-R434W is intriguing, as this residue does not seem to be implicated in the direct interaction of the catalytic domain of PCSK9 with the EGF-A domain of the LDLR (8). The R434W variant occurs in a loop structure occurring in a hinge region between the catalytic domain and the Cys-His rich domain of PCSK9 (42) (supplementary Fig. II). However, because the Cys-His rich domain is critical for the sorting of the complex LDLR-PCSK9 toward endosomes/lysosomes for degradation (7), the R434W mutation may hamper such a process and hence result in a LOF (supplementary Fig. II).

The Leu insertion in the signal peptide of PCSK9 (p.L15ins1L or L10) is often associated with another variation, namely A53V, and this double variant has been reported to be associated with low plasma PCSK9 levels, a finding that supports the hypothesis that a modification in the signal peptide could subtly interfere with protein folding, processing, and/or secretion (43). A high level of PCSK9 (222 ng/ml) was observed in an hypercholesterolemic patient of African descent exhibiting the single variant A443T. Although rare in the Caucasian population, the A443T mutation is relatively frequent in African-Americans, where the heterozygous condition is associated with a wide range of cholesterol values (19). The PCSK9 mutation A443T has been reported in a case of mild and variable hypercholesterolemia (GOF), which is sensitive to diet, but the mutation did not segregate with the phenotype in the family (44). However, in homozygotes, it is associated with low levels of LDL-C (19, 44). Indeed, Benjannet et al. (17) showed in vitro that the A443T mutation resulted in an *O*-glycosylated protein that was more susceptible to furin cleavage, suggesting a LOF.

One of the main findings in this study was the high levels of PCSK9 in patients treated with two widely used cholesterol-lowering agents, statins and ezetimibe. We have already demonstrated that PCSK9 mRNA is upregulated *in vitro* by statins (28) via a pathway involving reduced intracellular cholesterol concentration and increased SREBP-2 levels (26, 27, 31). The present work supports the hypothesis of the *in vivo* upregulation of PCSK9 protein in plasma in response to statins. This is in line with the observation of Careskey et al. (31) that plasma PCSK9 increases as LDL-C goes down during 16 weeks of atorvastatin therapy. We also showed that plasma PCSK9 is even higher when ezetimibe and statin are used in combination (Fig. 6).

We surmise that the correlation between PCSK9 and the percent reduction in LDL-C is driven by the inhibition of cholesterol synthesis, as seen *in vitro*. One group reported the effect of statins when the PCSK9 gene was deleted in the mouse (16) and another when the gene was disrupted by a LOF mutation in humans (45). Both groups observed increased sensitivity to statin treatment when PCSK9 was either not expressed or expressed at low levels. Accordingly, to counteract the effect of cholesterol-lowering agents on PCSK9, it is likely that a potent inhibitor of PCSK9 used in combination with statins would greatly enhance LDL-C lowering.

Addition of ezetimibe, an inhibitor of intestinal cholesterol absorption, was associated with still higher PCSK9 levels (Fig. 6). Although PCSK9 mRNA is expressed in the small intestine (4), nothing is yet known of the function of PCSK9 in this tissue, except that, at least in the mouse, it is not a major contributor to circulating PCSK9 (13). Therefore, we cannot determine whether the high levels of plasma PCSK9 associated with ezetimibe treatment arise from increased production in the intestine or in the liver, the main PCSK9 producer. One possibility would be to test this drug on tissue-specific knockout mice lacking PCSK9 expression specifically in hepatocytes (13). Another group measured PCSK9 mRNA in peripheral blood mononuclear cells in 24 subjects and found a 5.5% increase after 2 weeks of combination treatment with 40 mg simvastatin and 10 mg

ezetimibe versus baseline (46). In accordance with this observation, four of our patients who were on ezetimibe alone had a mean PCSK9 concentration of 105 ng/ml, equivalent to that of untreated hypercholesterolemic patients. Finally, it was recently shown that monotherapy with fibrates also resulted in a significant downregulation of plasma PCSK9 by ~8.5%, paralleling the efficacy of fibrates in decreasing LDL-C and TG (29). It was also suggested that treatment with fibrates can suppress the induction of PCSK9 by statins while still resulting in lower LDL-C (47).

In conclusion, we report for the first time an ELISA method that measures total PCSK9 in plasma, which also allows the estimation of the relative proportion of the mature protein and the fragment cut by furin by Western blot. This method allowed the identification of a novel R434W variant exhibiting a partial LOF on LDLR degradation. This report is also the first demonstration that ezetimibe administration in combination with a statin is associated with a markedly high PCSK9 level, consistent with the ability of ezetimibe to significantly enhance the statin effect on LDL-C, as evidenced by a meta-analysis (48). If the high LDL-C concentrations still observed in patients during treatment reflect an increase in PCSK9 levels, drugs aimed at reducing PCSK9 expression would be expected to greatly enhance current cholesterol-lowering therapies. With the rapid pace of discoveries in the field, it is hoped that within a few years lead molecules reducing the level and/or activity of PCSK9 will be uncovered and that these will emerge for therapeutic use after clinical trials to assess their potency and safety. In that context, it was recently shown that administration of a monoclonal antibody that blocks the PCSK9-LDLR interaction to either mice or cynomolgus monkeys results in an ~80% drop in LDL-C lasting 10 days and that in mice, such an effect enhances the LDL-C lowering by the statin mevinolin (49).

8.1.6. Acknowledgments

The authors acknowledge the invaluable assistance of the nursing staff, especially Lise Patenaude and Rina Casoni Riberdy, and excellent technical assistance of Lise St-

Germain and secretarial assistance of Carole Tremblay. The authors also thank Dr. Delia Susan-Resiga for modeling the PCSK9 structure including its mutant R434W.

8.1.7. References

- 1 . Goldstein, J. L., Hobbs, H. H., and Brown, M. S. Familial hypercholesterolemia. 2863-2913. 2001. *In* The metabolic and molecular bases of inherited disease. Valle D, C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, B. Childs, and B. Volgestein, editors. Chapter 120, 8th edition. McGraw Hill, New York. 2863-2913.
- 2 . Innerarity, T. L., Weisgraber, K. H., Arnold, K. S., Mahley, R. W., Krauss, R. M., Vega, G. L., and Grundy, S. M. 1987. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 6919-6923
- 3 . Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derre, A., Vileger, 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. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat.Genet.* **34**, 154-156
- 4 . Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., and Chretien, M. 2003. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 928-933

- 5 . Seidah, N. G., Prat, A. 2007. The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J.Mol.Med.* **85**, 685-696
- 6 . 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. The Cellular Trafficking of the Secretory Proprotein Convertase PCSK9 and Its Dependence on the LDLR. *Traffic.* **8**, 718-732
- 7 . Zhang, D. W., Garuti, R., Tang, W. J., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. 2008. Structural requirements for PCSK9-mediated degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**, 13045-13050
- 8 . Kwon, H. J., Lagace, T. A., McNutt, M. C., Horton, J. D., and Deisenhofer, J. 2008. Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**, 1820-1825
- 9 . Park, S. W., Moon, Y. A., and Horton, J. D. 2004. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J.Biol.Chem.* **279**, 50630-50638
- 10 . 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. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J.Biol.Chem.* **279**, 48865-48875
- 11 . Maxwell, K. N., Fisher, E. A., and Breslow, J. L. 2005. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 2069-2074

- 12 . Cameron, J., Holla, O. L., Ranheim, T., Kulseth, M. A., Berge, K. E., and Leren, T. P. 2006. Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum.Mol.Genet.* **15**, 1551-1558
- 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. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): Hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* **48**, 646-654
- 14 . 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. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin. Invest* **116**, 2995-3005
- 15 . Luo, Y., Warren, L., Xia, D., Jensen, H., Sand, T., Petras, S., Qin, W., Miller, K. S., and Hawkins, J. 2009. Function and distribution of circulating human PCSK9 expressed extrahepatically in transgenic mice. *J Lipid Res.* **50**: 1581-1588.
- 16 . 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. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 5374-5379
- 17 . Benjannet, S., Rhainds, D., Hamelin, J., Nassoury, N., and Seidah, N. G. 2006. The proprotein convertase PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: Functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J Biol.Chem.* **281**, 30561-30572
- 18 . Zhao, Z., Tuakli-Wosornu, Y., Lagace, T. A., Kinch, L., Grishin, N. V., Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. 2006. Molecular Characterization of Loss-of-Function

Mutations in PCSK9 and Identification of a Compound Heterozygote. *Am.J Hum.Genet.* **79**, 514-523

- 19 . Kotowski, I. K., Pertsemlidis, A., Luke, A., Cooper, R. S., Vega, G. L., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. 2006. A Spectrum of PCSK9 Alleles Contributes to Plasma Levels of Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *Am.J.Hum.Genet.* **78**, 410-422
- 20 . Abifadel, M., Rabes, J. P., Boileau, C., and Varret, M. 2007. [After the LDL receptor and apolipoprotein B, autosomal dominant hypercholesterolemia reveals its third protagonist: PCSK9.]. *Ann.Endocrinol.(Paris)*. 68: 138-146
- 21 . 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. A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum.Genet.* **114**, 349-353
- 22 . Naoumova, R. P., Tosi, I., Patel, D., Neuwirth, C., Horswell, S. D., Marais, A. D., van Heyningen, C., and Soutar, A. K. 2005. Severe hypercholesterolemia in four British families with the D374Y mutation in the PCSK9 gene: long-term follow-up and treatment response. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **25**, 2654-2660
- 23 . Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H., Jr., and Hobbs, H. H. 2006. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N.Engl.J Med.* **354**, 1264-1272
- 24 . Hooper, A. J., Marais, A. D., Tanyanyiwa, D. M., and Burnett, J. R. 2007. The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis* **193**, 445-448
- 25 . Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. 2009. PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J Lipid Res.* **50**, S172-S177

- 26 . Maxwell, K. N., Soccio, R. E., Duncan, E. M., Sehayek, E., and Breslow, J. L. 2003. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J.Lipid Res.* **44**, 2109-2119
- 27 . Horton, J. D., Shah, N. A., Warrington, J. A., Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. 2003. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 12027-12032
- 28 . Dubuc, G., Chamberland, A., Wassef, H., Davignon, J., Seidah, N. G., Bernier, L., and Prat, A. 2004. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **24**, 1454-1459
- 29 . Mayne, J., Dewpura, T., Raymond, A., Cousins, M., Chaplin, A., Lahey, K. A., Lahaye, S. A., Mbikay, M., Ooi, T. C., and Chretien, M. 2008. Plasma PCSK9 levels are significantly modified by statins and fibrates in humans. *Lipids Health Dis.* **7**, 22
- 30 . Lambert, G., Ancellin, N., Charlton, F., Comas, D., Pilot, J., Keech, A., Patel, S., Sullivan, D. R., Cohn, J. S., Rye, K. A., and Barter, P. J. 2008. Plasma PCSK9 concentrations correlate with LDL and total cholesterol in diabetic patients and are decreased by fenofibrate treatment. *Clin.Chem.* **54**, 1038-1045
- 31 . Careskey, H. E., Davis, R. A., Alborn, W. E., Troutt, J. S., Cao, G., and Konrad, R. J. 2008. Atorvastatin increases human serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Lipid Res.* **49**, 394-398
- 32 . Demacker, P. N., Veerkamp, M. J., Bredie, S. J., Marcovina, S. M., de Graaf, J., and Stalenhoef, A. F. 2000. Comparison of the measurement of lipids and lipoproteins versus assay of apolipoprotein B for estimation of coronary heart disease risk: a study in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* **153**, 483-490

- 33 . Mayer, G., Poirier, S., and Seidah, N. G. 2008. Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels. *J Biol.Chem.* **283**, 31791-31801
- 34 . Yue, P., Averna, M., Lin, X., and Schonfeld, G. 2006. The c.43_44insCTG variation in PCSK9 is associated with low plasma LDL-cholesterol in a Caucasian population. *Hum.Mutat.* **27**, 460-466
- 35 . Seidah, N. G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nassoury, N., Poirier, S., Essalmani, R., and Prat, A. 2008. The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **40**, 1111-1125
- 36 . Lambert, G. 2007. Unravelling the functional significance of PCSK9. *Curr.Opin.Lipidol.* **18**, 304-309
- 37 . Lakoski, S. G., Lagace, T. A., Cohen, J. C., Horton, J. D., and Hobbs, H. H. 2009. Plasma levels of PCSK9 in a large multiethnic population. *J Clin.Endocrinol.Metab.* **94**, 2537-2543
- 38 . Le May, C., Kourimate, S., Langhi, C., Chetiveaux, M., Jarry, A., Comera, C., Collet, X., Kuipers, F., Krempf, M., Cariou, B., and Costet, P. 2009. Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Null Mice Are Protected From Postprandial Triglyceridemia. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **29**, 684-690
- 39 . Alborn, W. E., Cao, G., Careskey, H. E., Qian, Y. W., Subramaniam, D. R., Davies, J., Conner, E. M., and Konrad, R. J. 2007. Serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is correlated directly with serum LDL cholesterol. *Clin.Chem.* **53**, 1814-1819
- 40 . Mayne, J., Raymond, A., Chaplin, A., Cousins, M., Kaefer, N., Gyamera-Acheampong, C., Seidah, N. G., Mbikay, M., Chretien, M., and Ooi, T. C. 2007.

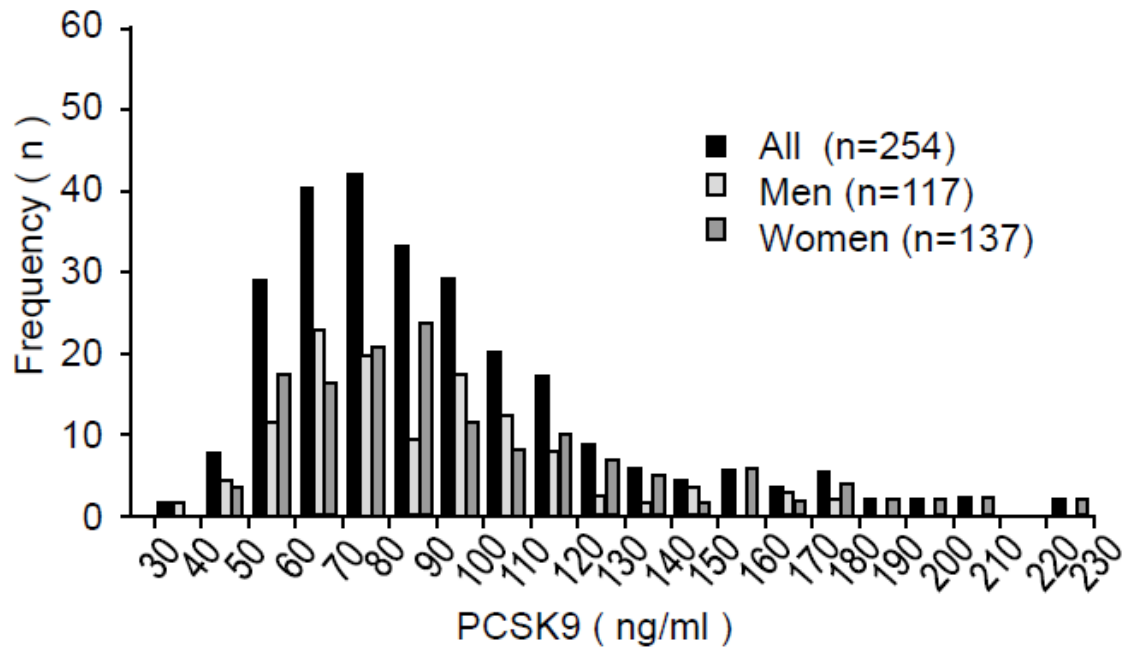
Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **361**, 451-456

- 41 . Wilhelmsen, L., Johansson, S., Rosengren, A., Wallin, I., Dotevall, A., and Lappas, G. 1997. Risk factors for cardiovascular disease during the period 1985-1995 in Goteborg, Sweden. The GOT-MONICA Project. *J Intern.Med.* **242**, 199-211
- 42 . 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. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat.Struct.Mol.Biol.* **14**, 413-419
- 43 . Abifadel, M., Bernier, L., Dubuc, G., Nuel, G., Rabes, J. P., Bonneau, J., Marques, A., Marduel, M., Devillers, M., Erlich, D., Varret, M., Roy, M., Davignon, J., and Boileau, C. 2008. A PCSK9 variant and familial combined hyperlipidemia. *J Med.Genet.* **45**, 780-786
- 44 . Allard, D., Amsellem, S., Abifadel, M., Trillard, M., Devillers, M., Luc, G., Krempf, M., Reznik, Y., Girardet, J. P., Fredenrich, A., Junien, C., Varret, M., Boileau, C., Benlian, P., and Rabes, J. P. 2005. Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum.Mutat.* **26**, 497-506
- 45 . Berge, K. E., Ose, L., and Leren, T. P. 2006. Missense Mutations in the PCSK9 Gene Are Associated With Hypocholesterolemia and Possibly Increased Response to Statin Therapy. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **26**, 1094-1100
- 46 . Gouni-Berthold, I., Berthold, H. K., Gylling, H., Hallikainen, M., Giannakidou, E., Stier, S., Ko, Y., Patel, D., Soutar, A. K., Seedorf, U., Mantzoros, C. S., Plat, J., and Krone, W. 2008. 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* **198**, 198-207
- 47 . Kourimate, S., Le May, C., Langhi, C., Jarnoux, A. L., Ouguerram, K., Zair, Y., Nguyen, P., Krempf, M., Cariou, B., and Costet, P. 2008. Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J.Biol.Chem.* **283**, 9666-9673
- 48 . Mikhailidis, D. P., Sibbring, G. C., Ballantyne, C. M., Davies, G. M., and Catapano, A. L. 2007. Meta-analysis of the cholesterol-lowering effect of ezetimibe added to ongoing statin therapy. *Curr.Med.Res.Opin.* **23**, 2009-2026
- 49 . 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. From the Cover: A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106**, 9820-9825

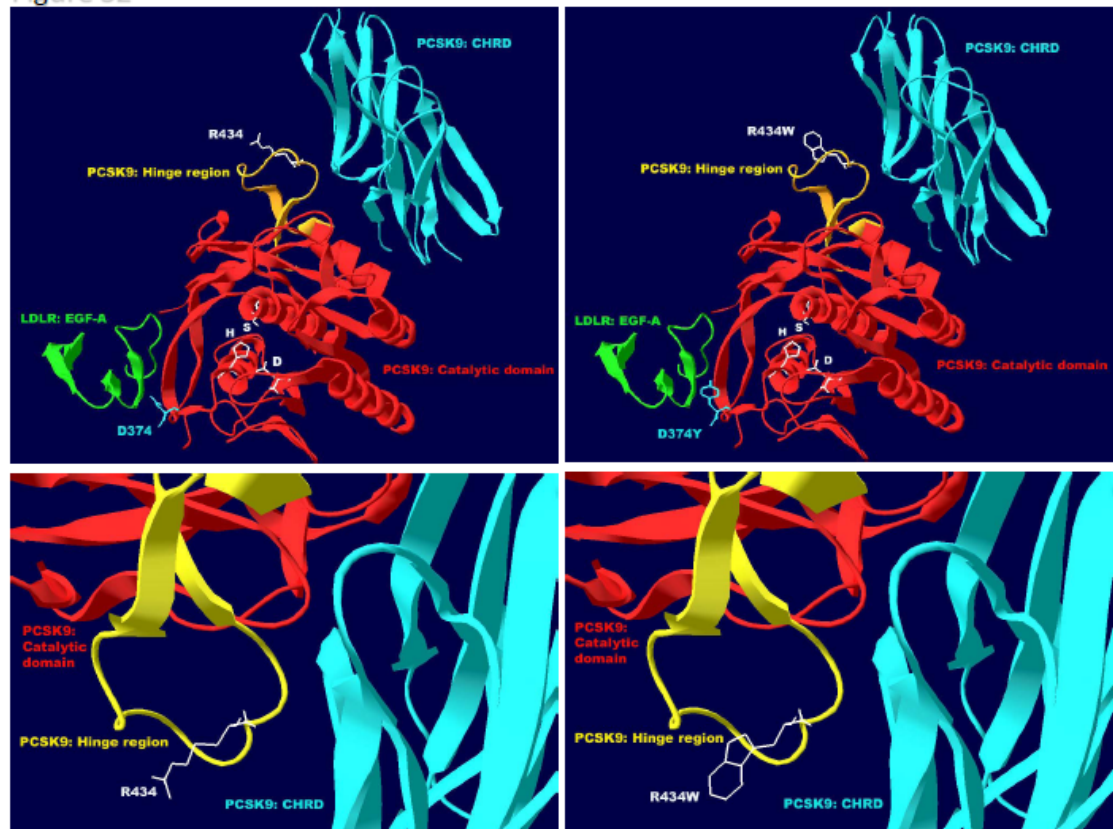
8.1.8. Supplemental Data

PCSK9 measured by ELISA [Mean: 89 ± 32 ng/ml]



Supplemental Figure S1: The cohort consisted of 117 males and 137 females ranging from 20 to 77 years of age. Plasma was diluted 1:20 and PCSK9 measured by sandwich ELISA as described.

Figure S2



Supplemental Figure S2: Modeling of the human PCSK9-R434W mutation (overall and zoomed version) based on reported crystal structure coordinates (8;42). Notice that the R434W mutation occurs in a hinge region (yellow) between the catalytic domain (red) and the CHRD (blue). For reference, we present the positions of the active site Asp186, His226 and Ser386 (white) as well as the Tyr374 (blue) implicated in LDLR-binding and of which mutation D374Y results in severe hypercholesterolemia.

8.2. La PCSK9 plasmatique est associée à l'âge, au genre et à plusieurs marqueurs métaboliques dans un échantillon représentatif d'enfants et d'adolescents

Article #4:

Plasma PCSK9 Is Associated with Age, Sex, and Multiple Metabolic Markers in a Population-Based Sample of Children and Adolescents

Alexis Baass,[†] Geneviève Dubuc,[†] Michel Tremblay, Edgard E. Delvin, Jennifer O'Loughlin, Emile Levy, Jean Davignon, and Marie Lambert

Publié dans *Clinical Chemistry*, 2009, volume 55(9), pages 1637-1645.

[†] A. Baass and G. Dubuc contributed equally to this work.

L'objectif de ce quatrième article était de mesurer la concentration plasmatique de PCSK9 dans une cohorte pédiatrique. Geneviève Dubuc et Alexis Baass ont effectués les dosages de la PCSK9, les analyses des résultats et la rédaction du manuscrit. Michel Tremblay a participé à la mesure de la PCSK9 et à l'analyse des résultats. Edgar E Delvin, Jennifer O'Loughlin et Émile Levy ont participé au recrutement des sujets de la cohorte pédiatrique. Dre Marie Lambert a participé au recrutement des sujets, à l'analyse des résultats ainsi qu'à la rédaction du manuscrit. Dr Jean Davignon a participé à la rédaction du manuscrit et a supporté financièrement le projet (Pfizer; HARG3).

8.2.1. Abstract

BACKGROUND: Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is a protein convertase that posttranslationally promotes the degradation of the low-density lipoprotein receptor (LDLR) in hepatocytes and increases plasma LDL cholesterol (LDL-C). Heterozygote gain-of-function mutations of PCSK9 are associated with the familial hypercholesterolemia phenotype, whereas loss-of-function variants are associated with reduced LDL-C concentrations and lower coronary risk. Plasma PCSK9 correlates with body mass index, triglyceridemia, total cholesterol, and LDL-C in adults, but no data are available in youth.

METHODS: We studied 1739 French Canadian youth ages 9, 13, and 16 years who participated in the Quebec Child and Adolescent Health and Social Survey, a province-wide school-based survey conducted in 1999. An ELISA assay was used to measure plasma PCSK9.

RESULTS: The mean (SD) plasma PCSK9 concentration was 84.7 (24.7) $\mu\text{g/L}$ in the sample. In boys, plasma PCSK9 decreased with age, whereas the inverse was true for girls. There were statistically significant positive associations between PCSK9 and fasting glucose, insulin, and HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance). In multivariable analysis, a 10% higher fasting insulin was associated with a 1%–2% higher PCSK9 in both sexes. There were also positive associations between PCSK9 and total cholesterol, LDL-C, and triglycerides, as well as with HDL-C and apolipoproteins A1 and B.

CONCLUSIONS: PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in youth. A novel finding is that PCSK9 is associated with fasting insulinemia, which suggests that PCSK9 could play a role in the development of dyslipidemia associated with the metabolic syndrome.

Nonstandard abbreviations: PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; LDLR, LDL receptor; FH, familial hypercholesterolemia; LDL-C, LDL cholesterol; BMI, body mass index; HDL-C, HDL cholesterol; TG, triglycerides; QCAHSS, Quebec Child

and Adolescent Health and Social Survey; apo, apolipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; SREBP-1c, sterol regulatory element– binding protein 1c.

8.2.2. Introduction

Proprotein convertase subtilisin kexin type-9 (PCSK9)⁶ is a 692–amino acid serine protease of 72 kDa that is encoded by the *PCSK9* gene located on chromosomal region 1p32.3 (1). *PCSK9* is mainly expressed in the liver, intestine, and kidney (2). The only known enzymatic function of PCSK9 is its own intramolecular autocatalytic processing in the endoplasmic reticulum, which is necessary for its activation and function. PCSK9 acts as a molecular chaperone that binds to the epidermal growth factor–like domain A of LDL receptor (LDLR) and promotes LDLR degradation (3, 4) through an endosomal/lysosomal pathway (5). In adults, PCSK9 is produced primarily by the liver and the intestine, but only the liver releases it into circulation (6). Circulating PCSK9 may be cleaved in the plasma by furin, another proprotein convertase, generating a residue of 474 amino acids (7).

Mutations of *PCSK9* are associated with either hypercholesterolemia (gain-of-function mutations) (8– 12) or hypocholesterolemia (loss-of-function mutations) (13–17). *PCSK9* gain-of-function mutations lead to the familial hypercholesterolemia (FH) phenotype; they account for approximately 2% of cases of FH (1). Retrospective studies have shown that carriers of *PCSK9* loss-of-function mutation R46L (3.6% of whites), Y142X, and C679X (2.6% of African Americans) are at a significantly reduced risk of cardiovascular atherosclerotic disease. The Y142X and C679X mutations are associated with a 28% reduction in plasma LDL cholesterol (LDL-C) and an 88% reduction in the rate of coronary events (18).

We have recently shown that plasma PCSK9 mass measured by ELISA correlates in adults with lipid and metabolic variables including total cholesterol, LDL-C, triglyceridemia, and fasting glycemia, as well as body mass index (BMI) (unpublished

results). No data on plasma PCSK9 have yet been published in children and adolescents. It is known that concentrations of total cholesterol, LDL-C, HDL cholesterol (HDL-C), and triglycerides (TG) vary by age and sex maturity stage in youth (19, 20). Variations in PCSK9 concentrations during puberty may contribute to these changes in lipid profile. Furthermore, PCSK9 concentrations measured during childhood may predict future cardiovascular disease.

The objective of this study was to describe the distribution of plasma PCSK9 in a population-based sample of children and adolescents and to examine the associations between PCSK9 and both metabolic and lipid variables.

8.2.3. Methods

STUDY POPULATION

The study population comprised children and adolescents who participated in the Quebec Child and Adolescent Health and Social Survey (QCAHSS), a school-based survey conducted between January and May 1999. Details on the survey design and methods have been reported (21). Briefly, the QCAHSS used a cluster sampling design to draw 3 independent, provincially representative samples of youth ages 9, 13, and 16 years. Questionnaire and anthropometric data were available for 83% (1267 of 1520), 79% (1186 of 1498), and 81% (1212 of 1495) of eligible 9-, 13-, and 16-year-olds, respectively. This current analysis was restricted to French Canadians, who comprised 80% (1019 of 1267), 79% (931 of 1186), and 78% (942 of 1212) of the 9-, 13-, and 16-year-old samples. Sixty-three percent (638 of 1019), 69% (640 of 931), and 75% (709 of 942) of 9-, 13-, and 16-year-olds provided a fasting blood sample. Of 1987 blood specimens available for analysis, 248 (12%) were excluded because the parents refused consent for analyses other than glucose and lipids, the samples had thawed on arrival at the laboratory, or the samples were of insufficient quantity for the PCSK9 assay. None of the participants used lipid-lowering medications. There were no differences in sex or BMI *z* scores between youth for whom

blood samples were retained or not retained for analysis. The study was approved by the Ethics Review Board of the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine. Written informed assent and consent were obtained from participants and their legal guardians, respectively.

VARIABLES

Height and weight were measured according to standardized protocols (21). BMI was computed as weight in kilograms divided by height in meters squared. Blood was obtained by venipuncture between 08h00 and 10h00 after an overnight fast in a 1-g/L EDTA collection tube that was kept on ice until centrifugation. Plasma was separated on site within 45 min of collection, frozen on dry ice, and sent within 24 h to the laboratory, where specimens were stored at -80 °C until analysis. The median duration of the fasting period was 13 h (range 9–17 h). Fasting plasma insulin, glucose, total cholesterol, TG, and HDL-C concentrations were measured as described (21, 22). LDL-C was calculated according to the Friedewald formula (23). Apolipoprotein B (apoB) and apoA-I concentrations were determined by nephelometry (Beckman Array Protein System). Plasma adiponectin was measured by RIA (Linco Research) (24). Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated as $\text{insulin (mU/L)} \times \text{glucose (mmol/L)} / 22.5$ (25).

PRODUCTION AND PURIFICATION OF ANTI-PCSK9 ANTIBODIES

We produced and purified recombinant truncated human PCSK9 (PCSK9; Met-amino acids 31–454) as described (5). It was injected into 2 rabbits by a standard protocol to generate a polyclonal antibody (hPCSK9-Ab). The antibodies were first prepurified by precipitation with ammonium sulfate (50% final concentration). After solubilization and dialysis of the precipitate, we purified the antibodies by affinity chromatography using a CNBr-activated Sepharose 4B column (GE Healthcare Bio-Sciences AB), coupled with the purified antigen (PCSK9). A fraction of this purified antibody was conjugated with horseradish peroxidase (hPCSK9-Ab-HRP) using the EZ-Link™ Plus Activated Peroxidase

protocol from Pierce. Finally, we purified the conjugated antibody from excess free horseradish peroxidase using the FreeZyme Conjugate Purification Kit (product 44920; Pierce). We confirmed the specificity of the antibody for PCSK9 by immunoprecipitation and Western blotting.

PCSK9 ELISA ASSAY

LumiNunc Maxisorp white assay plates were coated with 0.5 µg/well of hPCSK9-Ab by incubation at 37 °C for 3 h in PBS (Na₂HPO₄ 10 mmol/L, NaCl 0.15 mol/L, pH 7.4) containing sodium azide (1 g/L), then stored at 4 °C. Before use, the plates were washed 6 times with PBS containing Tween 20 (0.5 mL/L) and incubated for 1 h at room temperature with blocking buffer (PBS, casein 0.1%, merthiolate 0.01%). We prepared calibrators using serial dilutions of recombinant PCSK9 in dilution buffer (PBS, urea 1.8 mol/L, 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 before application (100 µL) in duplicate. The plates were incubated overnight at 37 °C with shaking. After washing, we added 100 µL hPCSK9-Ab-HRP diluted 1:750 for 3 h at 37 °C with shaking. Finally, after washing, we applied 100 µL substrate (SuperSignal™ ELISA Femto Substrate; Pierce) to each well. Chemiluminescence was quantitated on a Pherastar luminometer (BMG Labtech). We established a standard curve using a conditioned medium containing recombinant human PCSK9. This standard medium was calibrated by comparison with a full-length secreted and purified PCSK9 from a Baculovirus system in *HiFive* cells (donated by Rex Parker, Bristol-Myers Squibb). We determined peptide purity and concentration by quantitative amino acid analysis after 18–24 h of hydrolysis in the presence of 5.7N HCl under decreased pressure at 110 °C on a Beckman auto-analyzer (model 6300) with a postcolumn ninhydrin detection system coupled to a Varian DS604 data station (performed by Dr C. Lazure, Clinical Research Institute of Montreal, Quebec, Canada). We calculated plasma PCSK9 concentrations by comparing sample luminescence with that of the standard luminescence curve. The

interassay CV for the measurement of plasma PCSK9 was 7.2% (n = 48) at a concentration of 115 $\mu\text{g/L}$.

STATISTICAL ANALYSES

We used the nonparametric method developed by Hutson (26) to estimate age- and sex-specific percentiles and confidence intervals for PCSK9. To take the complex study design into account, sampling weights and clustering effects by school were estimated and incorporated into computations of means, percentile values, and 95% CIs. We used hierarchical maximum likelihood linear regression to estimate regression coefficients for univariate and multivariate associations. Explanatory variables (correlates) were treated as fixed effects, and clustering between participants in the same school was treated as a random effect. All continuous variables (BMI, lipids, apolipoproteins, glucose, insulin, HOMA-IR, adiponectin, PCSK9) were \log_e -transformed. The regression coefficient for the 100 \log_e -transformed-dependent variable represents the mean percentage change in the dependent variable per unit change in the explanatory variable (27). Because all explanatory variables (with the exception of age) were also \log_e -transformed, their units are also percentages. We performed statistical analyses with SAS software (SAS Institute) and SUDAAN (Research Triangle Institute).

8.2.4. Results

Table 1. Plasma concentrations of lipids, apolipoproteins, and selected metabolic variables in participants.^a

Variable ^a	Boys			Girls		
	Age 9 years	Age 13 years	Age 16 years	Age 9 years	Age 13 years	Age 16 years
n	282	290	302	271	248	346
BMI, kg/m ²	17.2 (2.7)	20.4 (3.2)	22.5 (3.8)	17.4 (2.8)	20.9 (3.7)	22.2 (3.7)
Lipids, mmol/L						
Total cholesterol	4.03 (0.61)	3.87 (0.54)	3.65 (0.67)	4.18 (0.64)	4.04 (0.58)	4.16 (0.76)
LDL-C	2.31 (0.51)	2.20 (0.45)	2.11 (0.56)	2.45 (0.56)	2.34 (0.51)	2.38 (0.66)
HDL-C	1.40 (0.25)	1.27 (0.19)	1.14 (0.19)	1.36 (0.21)	1.29 (0.19)	1.32 (0.23)
TG	0.69 (0.31)	0.86 (0.33)	0.89 (0.50)	0.82 (0.35)	0.89 (0.27)	1.0 (0.38)
ApoA-I, g/L	1.25 (0.16)	1.17 (0.13)	1.09 (0.13)	1.21 (0.14)	1.18 (0.13)	1.23 (0.17)
ApoB, g/L	0.64 (0.13)	0.63 (0.13)	0.63 (0.16)	0.69 (0.15)	0.66 (0.13)	0.71 (0.20)
Fasting glucose, mmol/L	5.2 (0.3)	5.3 (0.3)	5.3 (0.4)	5.0 (0.3)	5.2 (0.3)	5.0 (0.3)
Fasting insulin, pmol/L	28.4 (18.7)	49.7 (32.3)	45.0 (35.1)	31.4 (14.7)	56.4 (21.5)	49.6 (22.0)
HOMA-IR	0.92 (0.63)	1.65 (1.12)	1.49 (1.12)	0.98 (0.48)	1.83 (0.75)	1.56 (0.73)
Adiponectin, mg/L	11.2 (3.7)	9.1 (2.9)	8.2 (2.8)	12.5 (4.0)	11.0 (3.1)	10.2 (3.1)

^a Data are mean (SD).

Table 1 presents the characteristics of participants. Plasma PCSK9 ranged from 17.6 to 211.7 $\mu\text{g/L}$, with a CV of 29% across all age and sex groups. Mean PCSK9 concentrations were higher in girls than boys (86.6 vs 82.2 $\mu\text{g/L}$; $P = 0.004$). The association of age with plasma PCSK9 varied significantly as a function of sex ($P_{\text{interaction}} < 0.0001$). Therefore, all analyses were stratified by sex. Sex-specific distributions of PCSK9 were skewed positively (see Supplemental Fig. 1, which accompanies the online version of this article at www.clinchem.org/content/vol55/issue9).

Table 2. Distribution of PCSK9 concentrations ($\mu\text{g/L}$) by sex and age.

	Boys			Girls		
	Age 9 years	Age 13 years	Age 16 years	Age 9 years	Age 13 years	Age 16 years
n	282	290	302	271	248	346
Percentile (95th CI)						
5th	54.7 (51.1–57.8)	48.3 (44.9–50.9)	50.1 (46.5–52.9)	48.8 (43.6–52.8)	55.6 (51.1–58.8)	52.3 (45.7–57.4)
10th	58.3 (56.3–61.4)	52.8 (49.5–57.3)	54.7 (51.7–57.7)	56.6 (50.9–58.0)	60.9 (56.5–62.9)	59.3 (54.6–63.4)
25th	71.4 (67.0–75.3)	63.9 (61.3–65.7)	62.1 (60.8–64.2)	66.3 (62.4–68.8)	70.9 (67.9–74.5)	69.9 (66.5–73.3)
50th	85.1 (82.3–87.1)	77.5 (74.8–81.6)	74.8 (71.3–78.2)	79.2 (75.9–82.2)	86.4 (83.7–90.1)	85.8 (83.2–90.1)
75th	101.3 (98.1–105.3)	96.2 (92.9–100.9)	92.1 (87.9–98.1)	95.4 (92.4–98.9)	103.9 (100.8–108)	103.5 (99.2–107.6)
90th	116.9 (111.2–125.3)	116.1 (109.9–123.5)	115.7 (109.2–126.3)	108.1 (105.8–118.6)	117.7 (113.6–125.8)	124.2 (116.3–132.2)
95th	129.4 (123.3–149.7)	131.0 (120.6–135.9)	130.7 (122.4–140.2)	120.2 (114.8–132.4)	137.3 (124.5–143.9)	135 (128.8–141.4)
Mean (95th CI)	87.8 (84.9–90.8)	81.9 (78.9–85.0)	80.4 (77.4–83.3)	81.7 (78.8–84.5)	89.3 (86.2–92.4)	88.6 (85.9–91.3)

Age- and sex-specific means and percentile values of PCSK9 concentrations are presented in Table 2. Nine-year-old boys had higher mean PCSK9 concentrations than 13- and 16-year-old boys ($P = 0.002$ and 0.0002 , respectively). In contrast, 9-year-old girls had lower mean concentrations than 13- and 16-year-old girls ($P = 0.0004$ and 0.0005 , respectively). For all percentiles reported (5th to 95th), 9-year old boys had higher values of PCSK9 concentrations than 9-year-old girls, whereas the reverse was true for 13- and 16-year olds. In fact, although 9-year-old boys started with higher PCSK9 concentrations than same-age girls, 16-year-old boys ended up with lower values than same-age girls.

Table 3. Univariate association between PCSK9 and age and selected metabolic variables by sex.

Explanatory variable	Boys (n = 874)			Girls (n = 865)		
	β , % Δ^a	SE	P	β , % Δ	SE	P
Age, years						
9	Ref			Ref		
13	-8.3	2.7	0.002	9.4	2.6	0.0004
16	-10.0	2.7	0.0002	8.7	2.5	0.0005
BMI, 10% Δ	-0.2	0.5	0.60	0.3	0.5	0.47
Glucose, 10% Δ	7.9	1.4	<0.0001	3.6	1.3	0.008
Insulin, 10% Δ	1.1	0.2	<0.0001	1.1	0.2	<0.0001
HOMA-IR, 10% Δ	1.1	0.2	<0.0001	1.0	1.0	<0.0001
Adiponectin, 10% Δ	0.7	0.3	0.005	0.5	0.3	0.05

^a For all explanatory variables except age, β refers to the percentage difference in mean PCSK9 concentrations for a 1-unit increment (10% change) in explanatory variable. For age, β refers to the percentage difference in mean PCSK9 concentrations for 13- or 16-year-olds compared with the 9-year-old reference group. % Δ , percentage change; P, probability value for the regression coefficient; Ref, reference group.

Table 3 shows the sex-specific univariate associations between PCSK9 and selected metabolic variables. Fasting plasma glucose and insulin, HOMA-IR, and adiponectin showed significant positive associations with PCSK9 concentration in both sexes. We detected no significant univariable association between BMI and PCSK9. After adjustment for age, glucose, insulin, and adiponectin, however, BMI was negatively associated with PCSK9: a 10% higher BMI was associated with a 1.5% and 1.8% lower PCSK9 in boys and girls, respectively (Table 4). In contrast, after

adjustment for age, BMI, insulin, and adiponectin, glucose was no longer significantly associated with PCSK9 in girls. Glucose remained associated with PCSK9 after adjustment for age and the other metabolic variables in boys: a 10% higher glucose was associated with a 5.5% higher PCSK9. The strength of the associations between PCSK9 and both insulin and adiponectin did not change substantially after adjustment for age and the other metabolic variables. Pearson coefficients of correlation between PCSK9 and, BMI, glucose,

Table 4. Multivariable association between PCSK9 and age and selected metabolic variables by sex.

Explanatory variable	Boys (n = 874)			Girls (n = 865)		
	β , % Δ^a	SE	P	β , % Δ	SE	P
Age, years						
9	Ref			Ref		
13	-14.0	2.7	<0.0001	5.2	2.9	0.08
16	-12.5	2.9	<0.0001	8.2	2.8	0.003
BMI, 10% Δ	-1.5	0.7	0.02	-1.8	0.6	0.003
Glucose, 10% Δ	5.5	1.4	0.0001	0.8	0.3	0.57
Insulin, 10% Δ	1.7	0.2	<0.0001	1.3	0.2	<0.0001
Adiponectin, 10% Δ	0.6	0.3	0.02	0.8	0.3	0.004

^a For all explanatory variables except age, β refers to the percentage difference of mean PCSK9 concentration for a 1-unit increment (10% change) in the explanatory variable after adjustment for all other variables in the model. For age, β refers to the percentage difference in mean PCSK9 concentration in 13- and 16-year-olds compared with the 9-year-old reference group after adjustment for all other variables in the model. % Δ , percentage change; P, probability value for the regression coefficient; Ref: reference group.

insulin, and adiponectin as well as scatter plots are presented in online Supplemental Table 1 and online Supplemental Fig. 2.

Table 5 presents the associations between PCSK9 and lipid variables. In both sexes, a 10% higher plasma PCSK9 concentration was associated with a 1%–2% higher total cholesterol, LDL-C, and apoB and a 2%–3% higher TG. Interestingly, there was a significant association between PCSK9 and HDL-C in both sexes, as well as an association with apoA-I. The strength of the associations between PCSK9 and each of the lipid and apolipoprotein variables did not change substantially after adjustment for age, BMI, insulin, adiponectin, and glucose. Pearson coefficients of correlation between PCSK9 and both lipids and apolipoproteins as well as scatter plots are presented in online Supplemental Table 2 and online Supplemental Fig. 3.

insulin, and adiponectin as well as scatter plots are presented in online Supplemental Table 1 and online Supplemental Fig. 2.

Table 5 presents the associations between PCSK9 and lipid variables. In both sexes, a 10% higher plasma PCSK9 concentration was associated with a 1%–2% higher total cholesterol, LDL-C, and apoB and a 2%–3% higher TG. Interestingly, there was a significant association between PCSK9 and HDL-C in both sexes, as well as an association with apoA-I. The strength of the

Table 5. Association between PCSK9 and plasma lipids and apolipoproteins by sex.								
Model	Dependent variable	Explanatory variable	Boys (n = 874)			Girls (n = 865)		
			β , % Δ^a	SE	P	β , % Δ	SE	P
1	Total cholesterol	PCSK9, 10% Δ						
	Not adjusted		1.5	0.2	<0.0001	1.5	0.2	<0.0001
	Adjusted ^b		1.3	0.2	<0.0001	1.5	0.2	<0.0001
2	LDL-C	PCSK9, 10% Δ						
	Not adjusted		1.7	0.3	<0.0001	1.6	0.3	<0.0001
	Adjusted		1.6	0.3	<0.0001	1.8	0.3	<0.0001
3	ApoB	PCSK9, 10% Δ						
	Not adjusted		1.7	0.3	<0.0001	1.5	0.3	<0.0001
	Adjusted		1.6	0.3	<0.0001	1.7	0.3	<0.0001
4	HDL-C	PCSK9, 10% Δ						
	Not adjusted		0.6	0.2	0.01	0.9	0.2	<0.0001
	Adjusted		0.5	0.2	0.02	0.9	0.2	<0.0001
5	ApoA1	PCSK9, 10% Δ						
	Not adjusted		0.5	0.2	0.009	0.8	0.2	<0.0001
	Adjusted		0.5	0.2	0.002	0.7	0.2	<0.0001
6	Triglycerides	PCSK9, 10% Δ						
	Not adjusted		3.1	0.5	<0.0001	2.5	0.5	<0.0001
	Adjusted		2.3	0.5	<0.0001	2.0	0.5	<0.0001

^a β refers to the percentage difference in mean concentration of the dependent variable for a 1-unit increment (10% change) in the explanatory variable (PCSK9). % Δ , percentage change; P, probability value for the regression coefficient.

^b Adjusted for age, BMI, and plasma concentrations of insulin, glucose, and adiponectin.

8.2.5. Discussion

In this study, we present the first description of the distribution of plasma PCSK9 in a large population-based sample of white children and adolescents. Average plasma PCSK9 concentrations were slightly lower in our pediatric population than in an adult population (unpublished data) in which PCSK9 was measured using the same method [mean (95% CI) 84.8 (83.5–86.0) vs 89.5 (85.6–93.4) $\mu\text{g/L}$, respectively]. Interestingly, there were no sex differences in PCSK9 concentrations in adults, whereas significant differences were observed in youth. Moreover, sex modified the association between age and PCSK9 in youth.

We observed that plasma PCSK9 concentrations were significantly higher in 9-year-old boys than in 13- and 16-year-old boys. In contrast, plasma PCSK9 concentrations were significantly lower in 9-year-old girls than in 13- and 16-year-old girls. We suggest that these differences contribute to the differences in total cholesterol and LDL-C concentrations observed between boys and girls during childhood and adolescence. It is well established that plasma total cholesterol and LDL-C peak at 9–10 years of age, decrease during pubertal development, and then increase thereafter (28). It is also known that there is a significant effect of sex on the concentrations of both total cholesterol and LDL-C in youth. Specifically, compared to girls, more important decreases in total cholesterol are observed in boys between 9 and 16 years of age (approximately 18% and 10%, respectively) (28). Our data indicated that decreases in total cholesterol with age in boys were consistent with decreases in plasma PCSK9. In girls, higher concentrations of total cholesterol observed at 13–14 years coincided with the peak in plasma PCSK9 concentrations. The sex differences in PCSK9 concentrations during puberty may in part explain differences in total cholesterol concentrations between boys and girls during this period (Fig. 1).

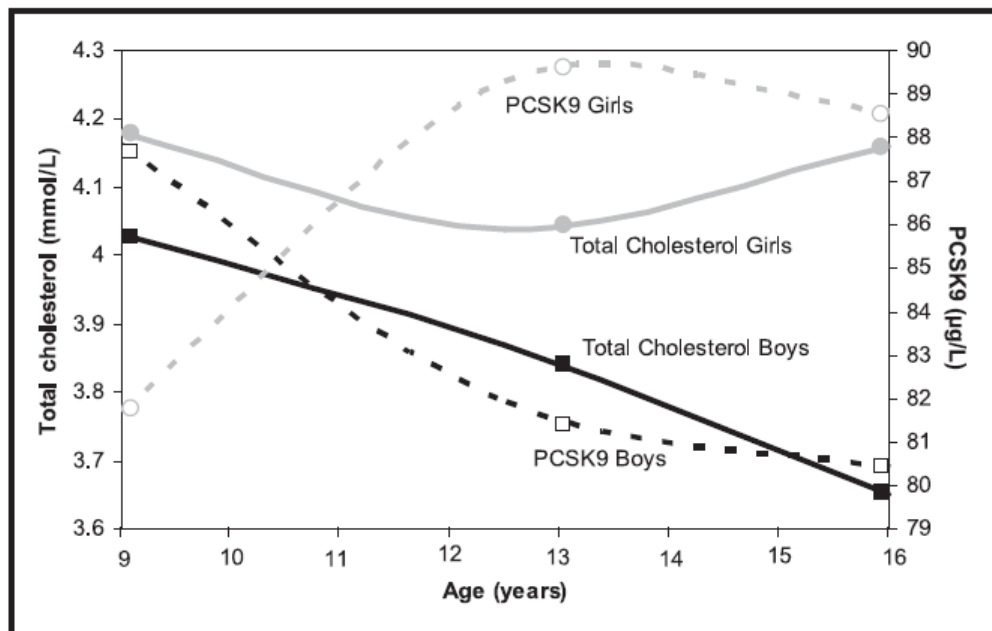


Fig. 1. Mean plasma total cholesterol and PCSK9 concentrations in boys and girls ages 9, 13, and 16 years and interpolation between these ages. In boys, mean total cholesterol (black squares) is higher in 9-year-olds than in 13-year-olds and higher in 13-year-olds than in 16-year-olds. There is a similar age effect on mean plasma PCSK9 concentrations (open squares). In girls, mean total cholesterol (gray circles) is higher in 9-year-olds than in 13-year-olds, whereas 16-year-old girls have a higher mean plasma total cholesterol concentration than do 13-year-old girls. There is an inverse age effect on mean plasma PCSK9 concentrations (open circles) in girls.

In contrast, there was no evidence for age-by-genotype interactions in the Bogalusa Heart Study, which focused on loss-of-function mutations in PCSK9 in children and adolescents (29). However, plasma PCSK9 concentrations were not measured and only sex-adjusted lipid profiles were shown, so the effect of sex on the phenotypic expression of the PCSK9 mutation remained unknown.

Differences between sexes and during pubertal development suggest an influence of sex hormones on plasma PCSK9 concentrations. Very little is known about this topic. Studies in rodents show that treatment with high doses of ethinylestradiol result in a 50% decrease in PCSK9 gene expression and protein (30). It is interesting that in girls, plasma PCSK9 concentrations level off at approximately 13 years, an age by which the majority of girls have begun puberty and estradiol production is greatly augmented (31). There are to our knowledge no studies that explore the relationship between testosterone and PCSK9. It is also very likely that other factors play a role in the regulation of PCSK9 during puberty. Indeed, studies in rodents show that growth hormone stimulation increases the level of intracellular PCSK9 mRNA (32).

Independent of age, BMI, glucose, and adiponectin, insulin was positively associated with PCSK9 concentrations in both sexes. Previous studies in rodents demonstrate the importance of insulin in PCSK9 regulation. After induction of type 1 diabetes in rats by streptozotocin injection, Niesen et al. (33) observed a significant reduction in LDLR mRNA while LDLR protein was unaffected. This was explained by a

marked decrease in PCSK9 protein in hypoinsulinemic rats, thus reducing LDLR degradation. Further evidence of the importance of insulin in the regulation of PCSK9 concentrations is available in studies of hyperinsulinemia in rodents. Hyperinsulinemic clamps upregulated PCSK9 mRNA in rats (34), and this was shown to be through the action of insulin on sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c), which regulates PCSK9 transcription. Conversely, glucose had no effect on PCSK9 mRNA in rodent primary hepatocytes. However, we observed a positive association between glucose and PCSK9. It is interesting that the strength of the association between fasting glucose and PCSK9 was attenuated after adjustment for other metabolic variables (a 10% higher glucose was associated with an 8% and 6% higher plasma PCSK9 in univariable and multivariable models, respectively, in boys, and a 4% and 1% increase in PCSK9, respectively, in girls). Because insulin was associated with PCSK9 and also accounted for part of the variance in glucose when predicting PCSK9, it may be that insulin plays a mediating role in the glucose and PCSK9 relationship. Taken together, these results indicate an important role for insulin in the regulation of PCSK9 expression. PCSK9 could contribute to the development of the hyperinsulinemic dyslipidemia observed in patients with the metabolic syndrome or diabetes (35).

Adiponectin had a small but significant positive effect on PCSK9 concentrations even after controlling for BMI, glucose, and insulin. No report is available in the literature on the association between adiponectin and PCSK9 in humans or in animal studies.

We observed a positive association between PCSK9 and both total cholesterol and LDL-C, similar to that in adults (36–38). A 10% higher plasma PCSK9 was associated with a 1.7% higher LDL-C. This increase may appear small, but contributes significantly to the interindividual variation in plasma LDL-C. Individuals with a plasma PCSK9 concentration of 180 $\mu\text{g/L}$ (95th percentile) have a mean LDL-C concentration that is 0.3 mmol/L higher than individuals with a plasma PCSK9 concentration of 55 $\mu\text{g/L}$ (5th percentile). Similar variation in PCSK9 contributes to a mean change of 0.5 mmol/L in total cholesterol. There

was a strong association between PCSK9 and plasma TG. Recent studies show that a polymorphism in PCSK9 (p.L21 tri) is associated with familial combined hyperlipidemia (hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia) (39). There is currently no clear mechanistic explanation for the association between PCSK9 and TG, but VLDL may be less efficiently cleared when the apoB/E receptor (LDLR) is degraded by PCSK9.

In contrast to adults (36–38), there was a positive association between PCSK9 and HDL-C in both boys and girls. Differences in the power to detect an association related to sample size could explain these discrepant results: the larger sample size in the current analysis allowed us to detect small but significant differences. The mechanisms explaining the association between PCSK9 and HDL-C remain to be identified. Mice in which the PCSK9 gene has been knocked out presented a reduction in HDL-C (6, 40). A possible hypothesis is that apo-E-containing HDL particles may be cleared less efficiently when the LDLR is degraded by PCSK9.

A limitation of the study is that PCSK9 measurement is not standardized across laboratories, so concentrations measured in our study are not directly comparable to those measured in another laboratory using a different method. Because we restricted our study to a French Canadian sample, the findings may not be generalizable to other populations. To date, there is no evidence of heterogeneity in the effect of PCSK9 on LDL receptor metabolism between populations. In cross-sectional studies, we cannot infer causality between factors examined.

In conclusion, our study in a large population-based sample of children and adolescents showed that mean plasma concentrations of PCSK9 vary by age in a sex-dependent manner. Similar to those in adults, we found positive associations between PCSK9 and total cholesterol, LDL-C, and TG. We extended these findings by demonstrating a relationship between plasma PCSK9 and each of fasting insulinemia and HDL-C. Our results suggest a role for insulin in the regulation of PCSK9, which may explain in part the dyslipidemia observed in the metabolic syndrome and diabetes. Further,

similar to PCSK5 (1), PCSK9 may play a role in HDL-C metabolism. Large prospective human studies, as well as cellular and animal research, are needed to better understand PCSK9 metabolism and actions.

8.2.6. Acknowledgments

Author Contributions: All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

Authors' Disclosures of Potential Conflicts of Interest: Upon manuscript submission, all authors completed the Disclosures of Potential Conflict of Interest form. Potential conflicts of interest:

Employment or Leadership: None declared.

Consultant or Advisory Role: J. Davignon, BMS, Roche, and Merck Canada.

Stock Ownership: None declared.

Honoraria: J. Davignon, BMS, Roche, and Merck Canada.

Research Funding: The survey was funded by the Québec Ministry of Health and Social Services and by Health Canada. This study was partly supported by the Canadian Institutes of Health Research. J. O'Loughlin holds a Canada Research Chair in the Early Determinants of Adult Chronic Disease, and E. Levy holds the JA de Sève Nutrition Chair. J. Davignon, Merck Canada, Pfizer Canada, and AstraZeneca Canada.

Expert Testimony: None declared.

Role of Sponsor: The funding organizations played no role in the design of study, choice of enrolled patients, review and interpretation of data, or preparation or approval of manuscript.

Acknowledgments: We thank Hanny Wassef for proofreading this manuscript.

8.2.7. References

1. Seidah NG, Prat A. The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med* 2007;85:685–96.
2. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:928–33.
3. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem* 2007; 282:18602–12.
4. Kwon HJ, Lagace TA, McNutt MC, Horton JD, Deisenhofer J. Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:1820–5.
5. Nassoury N, Blasiolo DA, Tebon Oler A, Benjannet S, Hamelin J, Poupon V, et al. The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic* 2007;8:718–32.
6. Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Hamelin J, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* 2008;48:646–54.
7. 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* 2006; 281:30561–72.
8. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003;34:154–6.
9. Allard D, Amsellem S, Abifadel M, Trillard M, Devillers M, Luc G, et al. Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 2005;26:497.

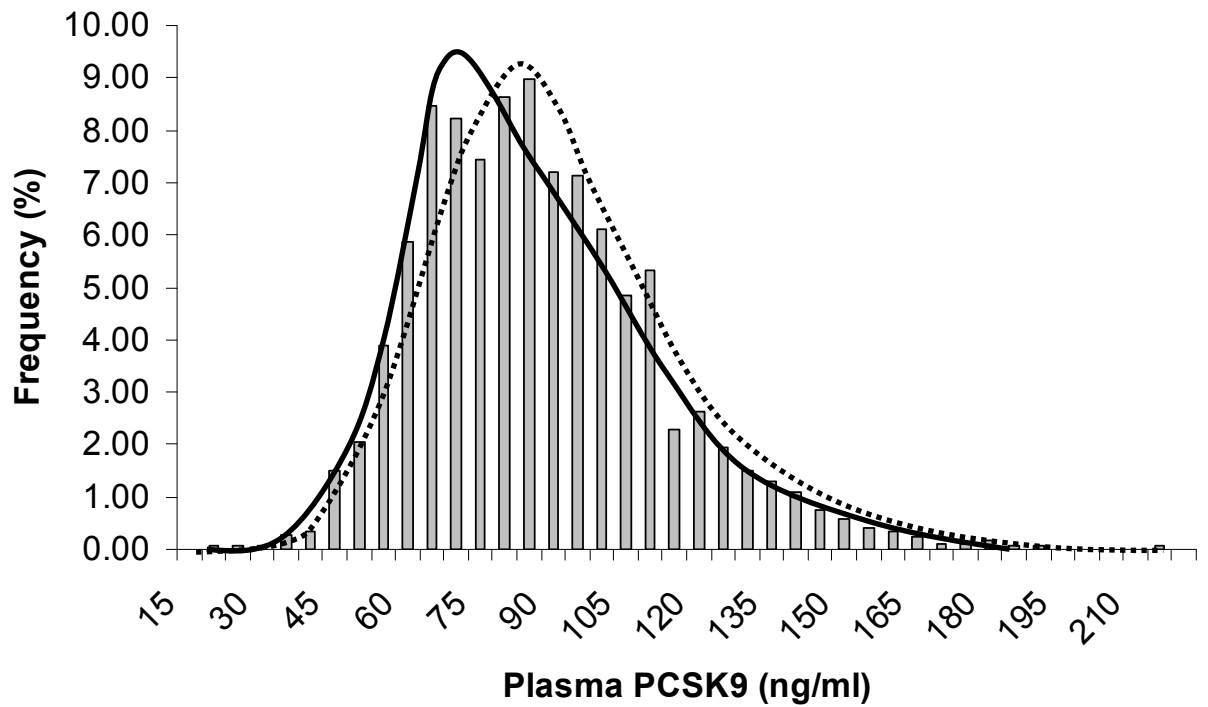
10. Leren TP. Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet* 2004;65:419–22.
11. Pisciotto L, Priore Oliva C, Cefalu AB, Noto D, Bellocchio A, Fresa R, et al. Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2006;186:433–40.
12. Timms KM, Wagner S, Samuels ME, Forbey K, Goldfine H, Jammulapati S, et al. A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet* 2004; 114:349–53.
13. 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* 2006; 26:1094–100.
14. 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* 2005;37:161–5.
15. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, Kinch L, Grishin NV, Horton JD, et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet* 2006;79:514–23.
16. Fasano T, Cefalu AB, Di Leo E, Noto D, Pollaccia D, Bocchi L, et al. A novel loss of function mutation of PCSK9 gene in white subjects with low-plasma low-density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:677–81.
17. Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, Cooper RS, Vega GL, Cohen JC, Hobbs HH. A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Hum Genet* 2006;78:410–22.
18. 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* 2006;354:1264–72.
19. Boulton TJ, Magarey AM, Cockington RA. Serum lipids and apolipoproteins from 1 to 15 years: changes with age and puberty, and relationships with diet, parental cholesterol and family history of ischaemic heart disease. *Acta Paediatr* 1995; 84:1113–8.

20. Bertrais S, Balkau B, Charles MA, Vol S, Calvet C, Tichet J, Eschwege E. Puberty-associated differences in total cholesterol and triglyceride levels according to sex in French children aged 10–13 years. *Ann Epidemiol* 2000;10:316–23.
21. Paradis G, Lambert M, O’Loughlin J, Lavallee C, Aubin J, Berthiaume P, et al. The Quebec Child and Adolescent Health and Social Survey: design and methods of a cardiovascular risk factor survey for youth. *Can J Cardiol* 2003;19:523–31.
22. Allard P, Delvin EE, Paradis G, Hanley JA, O’Loughlin J, Lavallee C, et al. Distribution of fasting plasma insulin, free fatty acids, and glucose concentrations and of homeostasis model assessment of insulin resistance in a representative sample of Quebec children and adolescents. *Clin Chem* 2003;49:644–9.
23. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18: 499–502.
24. Punthakee Z, Delvin EE, O’Loughlin J, Paradis G, Levy E, Platt RW, Lambert M. Adiponectin, adiposity, and insulin resistance in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91: 2119–25.
25. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–9.
26. Hutson A. Calculating nonparametric confidence intervals for quantiles using fractional ordered statistics. *J Appl Stat* 1999;26:343–53.
27. Cole TJ. Sympercents: symmetric percentage differences on the 100 log (e) scale simplify the presentation of log transformed data. *Stat Med* 2000;19:3109–25.
28. Labarthe DD, S. Fulton, J. Cholesterol screening in children: insights from the Project HeartBeat and NHANES III. *Prog Pediatr Cardiol* 2003;17: 169 –78.
29. Hallman DM, Srinivasan SR, Chen W, Boerwinkle E, Berenson GS. Relation of PCSK9 mutations to serum low-density lipoprotein cholesterol in childhood and adulthood (from the Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol* 2007;100:69–72.

- 30.** Persson L, Galman C, Angelin B, Rudling M. Importance of proprotein convertase subtilisin/ kexin type 9 in the hormonal and dietary regulation of rat liver low-density lipoprotein receptors. *Endocrinology* 2009;150:1140–6.
- 31.** Elmlinger MW, Kuhnel W, Ranke MB. Reference ranges for serum concentrations of lutropin (LH), follitropin (FSH), estradiol (E2), prolactin, progesterone, sex hormone-binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), cortisol and ferritin in neonates, children and young adults. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:1151–60.
- 32.** Galman C, Matasconi M, Persson L, Parini P, Angelin B, Rudling M. Age-induced hypercholesterolemia in the rat relates to reduced elimination but not increased intestinal absorption of cholesterol. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293: E737–42.
- 33.** Niesen M, Bedi M, Lopez D. Diabetes alters LDL receptor and PCSK9 expression in rat liver. *Arch Biochem Biophys* 2008;470:111–5.
- 34.** Costet P, Cariou B, Lambert G, Lalanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, et al. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem* 2006;281:6211–8.
- 35.** Brunzell JD, Ayyobi AF. Dyslipidemia in the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* 2003;115 Suppl 8A:24S–8S.
- 36.** Lambert G, Ancellin N, Charlton F, Comas D, Pilot J, Keech A, et al. Plasma PCSK9 concentrations correlate with LDL and total cholesterol in diabetic patients and are decreased by fenofibrate treatment. *Clin Chem* 2008;54:1038–45.
- 37.** Alborn WE, Cao G, Careskey HE, Qian YW, Subramaniam DR, Davies J, et al. Serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is correlated directly with serum LDL cholesterol. *Clin Chem* 2007;53:1814–9.
- 38.** Mayne J, Raymond A, Chaplin A, Cousins M, Kaefer N, Gyamera-Acheampong C, et al. Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:451–6.
- 39.** Abifadel M, Bernier L, Dubuc G, Nuel G, Rabes JP, Bonneau J, et al. A PCSK9 variant and familial combined hyperlipidaemia. *J Med Genet* 2008;45: 780–6.

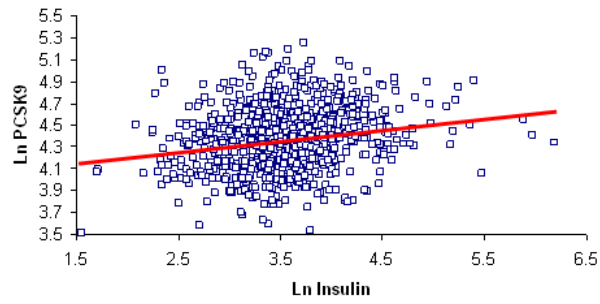
40. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, Ho YK, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. Proc Natl Acad SciUSA 2005; 102:5374–9.

8.2.8. Supplemental Data

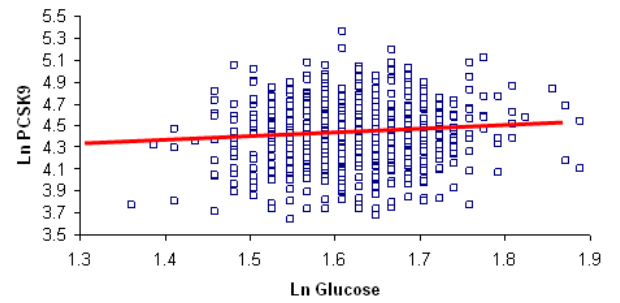
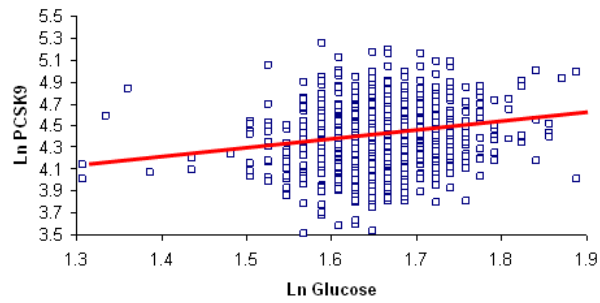
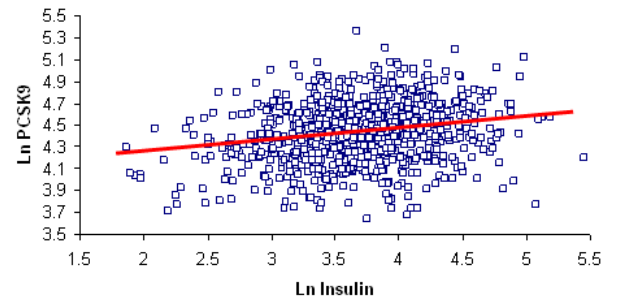


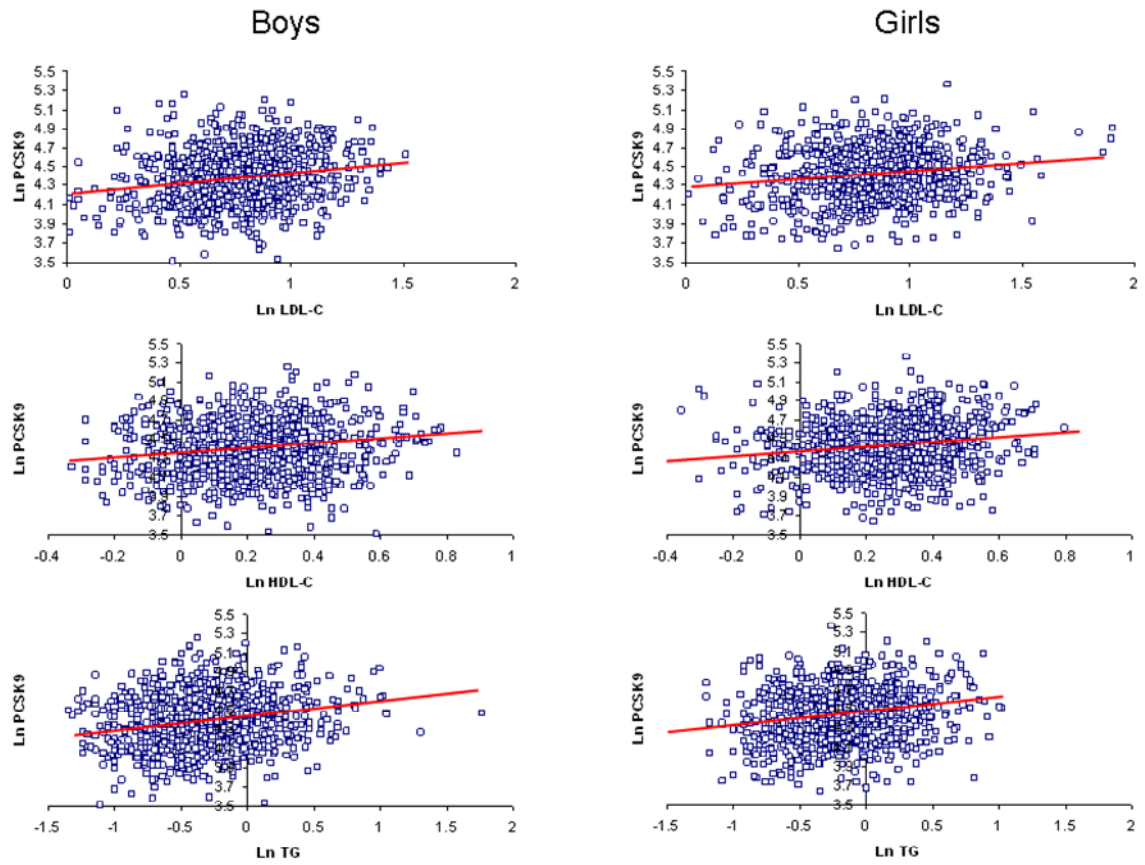
Supplemental Figure 1. Sex-specific distributions of plasma PCSK9 concentrations in the cohort. Black line: frequency for boys; dashed line: frequency for girls.

Boys



Girls





Supplemental Figure 2. Sex-specific scatter plots of correlation between PCSK9 and insulin, glucose, LDL-C, HDL-C and TG.

Supplemental Data Table 1: Pearson correlations between log_e PCSK9 and selected metabolic variables by sex

Metabolic variable	Boys (n=874)		Girls (n=865)	
	unadjusted	adjusted	unadjusted	adjusted
	r	r	r	r
Log _e BMI	-0.03	-0.06 ^a	0.03	-0.10 ^a
Log _e glucose	0.19	0.13 ^b	0.09	0.02 ^b
Log _e insulin	0.20	0.23 ^c	0.20	0.20 ^c
Log _e adiponectin	0.10	0.08 ^d	0.06	0.10 ^d

^a, adjusted for age, log_e glucose, log_e insulin, log_e adiponectin.

^b, adjusted for age, log_e BMI, log_e insulin, log_e adiponectin.

^c, adjusted for age, log_e BMI, log_e glucose, log_e adiponectin.

^d, adjusted for age, log_e BMI, log_e glucose, log_e insulin.

Supplemental Data Table 2: Pearson correlations between \log_e PLSK9 and \log_e -transformed lipids and apolipoproteins by sex

Metabolic variable	Boys (n=874)		Girls (n=865)	
	unadjusted	adjusted	unadjusted	adjusted
	r	r ^a	r	r ^a
Total cholesterol	0.25	0.20	0.23	0.23
LDL cholesterol	0.19	0.16	0.16	0.18
Apolipoprotein B	0.20	0.18	0.16	0.18
HDL cholesterol	0.10	0.06	0.14	0.15
Apolipoprotein A1	0.13	0.09	0.15	0.14
Triglycerides	0.19	0.16	0.18	0.14

^a, adjusted for age, body mass index and fasting plasma concentrations of insulin, glucose and adiponectin.

9. Discussion et perspectives futures

9.1. Résumé des résultats obtenus

Un haut taux de LDL dans la circulation est reconnu comme étant associé positivement avec l'incidence de développement de maladies cardiovasculaires. Depuis plus de vingt ans plusieurs stratégies ont été envisagées et testées afin de réduire le taux de cholestérol associé à ces lipoprotéines. Parmi ces stratégies, l'utilisation de statines, des inhibiteurs de synthèse de cholestérol qui induisent l'expression du récepteur de LDL, est très fréquente de nos jours. Malheureusement, ces statines peuvent avoir des effets secondaires et ne diminuent pas nécessairement l'incidence des maladies cardiovasculaires comme on le souhaiterait, donc d'autres stratégies ont leur intérêt. Cette thèse est basée sur une nouvelle stratégie reposant sur la PCSK9. Les travaux de plusieurs laboratoires dont celui de Nabil Seidah ont révélé l'importance de PCSK9 dans le niveau de récepteur de LDL. Étonnamment, cette convertase se retrouve en circulation et lorsqu'elle pénètre les cellules par la voie classique d'endocytose, elle empêche le récepteur de LDL d'être recyclé vers la surface cellulaire, réduisant ainsi la possibilité qu'a la cellule à retirer des LDL de la circulation.

L'objectif principal de la thèse était d'étudier la régulation de la PCSK9 dans des cellules d'origine humaine et dans le plasma humain. À cause de son association avec l'hypercholestérolémie familiale ⁶, nous avons voulu étudier le rôle de la PCSK9 dans l'homéostasie du cholestérol en testant plusieurs conditions pouvant moduler sa régulation. Les résultats de ce projet de doctorat comprennent des études réalisées *in vitro* sur des hépatocytes humains en culture primaire ou provenant de lignées cellulaires, ainsi que des études *in vivo* à partir d'échantillons de plasma humain.

9.1.1. PCSK9 *in vitro*

Nous avons démontré que le gène PCSK9 était régulé comme un gène typiquement cholestérogénique. Nous avons montré pour la première fois que l'expression de la PCSK9

était augmentée par les statines dans des hépatocytes humains. Ces résultats ont été obtenus avec cinq différentes statines ²⁹. Par la suite, afin de s'assurer que cet effet était bien dû à une diminution de la synthèse du cholestérol et non à un effet pléiotrope des statines, nous avons incubé les cellules dans un milieu déficient en cholestérol, pour supprimer l'apport à la cellule en cholestérol exogène, et avons observé une augmentation marquée de l'expression de l'ARNm de PCSK9, autant dans les HepG2 que dans des hépatocytes humains en culture primaire. Finalement, nous avons confirmé ces résultats en ajoutant du mévalonate (précurseur du cholestérol) avec ou sans statine au milieu de culture. Le mévalonate restaurait la synthèse de cholestérol et renversait l'effet de la statine sur l'expression de la PCSK9. Il est également intéressant de noter que l'induction de l'expression de PCSK9 par l'atorvastatine était le double de celle du LDLR. Ces résultats furent les premiers à démontrer que l'expression de PCSK9 était régulée par les statines et par une réduction du cholestérol intracellulaire dans les hépatocytes humains. Malheureusement, lorsque ces études ont été effectuées, la PCSK9 venait d'être découverte, et aucun anticorps fiable n'était disponible. Il aurait été très intéressant de pouvoir confirmer ces hausses de l'ARNm de PCSK9 en hausse de protéine intracellulaire ou sécrétée sous l'effet des statines. Or, depuis 2004, plusieurs groupes ont pu observer une hausse de la protéine PCSK9 suite à l'ajout d'une statine, autant dans les cellules en culture, que chez l'humain ^{58,59,171}.

Quelques groupes ont montré que l'expression de PCSK9 pouvait être modulée à la hausse par un agoniste synthétique du LXR, le TO901317 ^{56,61,66}. Cependant, l'utilisation d'un agoniste naturel du LXR dans notre étude, une combinaison de 22-hydroxycholestérol et de 9-cis-acide rétinoïque ²⁹, ou le 15-cétostérol (3 β -hydroxy-5 α -cholest-8(14)-en-15-one; un agoniste synthétique partiel du LXR) ¹⁷², n'a pas augmenté l'expression de PCSK9. Ces différences peuvent être causées par une régulation spécifique à l'espèce ou par des variations *in vivo* versus *in vitro*. De plus, les gènes dont l'expression est réduite par une accumulation de cholestérol et qui sont induit par le SREBP-2 ne sont habituellement pas un cible du LXR. Nos données suggèrent plutôt que la PCSK9 serait impliquée dans la

synthèse et l'apport de cholestérol dans la cellule. L'étude du promoteur de PCSK9, à l'aide du logiciel MathInspector, a montré la présence d'un site de liaison pour la SREBP-2 qui serait possiblement responsable de l'expression de PCSK9 en fonction de la concentration intracellulaire de cholestérol. La SREBP-2 ne représente qu'une possibilité de facteur de transcription pouvant réguler l'expression de PCSK9. Bien entendu, cette analyse de la séquence du promoteur de PCSK9 ne représentait que la première étape dans la détermination du mode de régulation de ce gène. Des études fonctionnelles à l'aide de mutagenèse et d'un gène rapporteur auraient pu compléter l'étude du promoteur de PCSK9. D'ailleurs, les travaux de Jeong *et al.*³⁰ démontrent bien dans les cellules HepG2 que l'expression de PCSK9 est totalement dépendante des stérols. La région minimale du promoteur requise pour l'expression de PCSK9 est celle comprenant un SRE, pouvant activer la transcription *via* la liaison de SREBP-1 ou SREBP-2. De plus, ces études suggèrent qu'*in vivo*, chez la souris, l'expression de PCSK9 dépendante des stérols se fait de façon prédominante par la SREBP-2.

Des résultats préliminaires dans les cellules HepG2 et Caco-2 portant sur l'effet de l'ezetimibe sur l'expression de PCSK9 ont été présentés dans l'article de la section 7.2. Dans cet article, nous avons observé que l'ajout d'ezetimibe à un traitement aux statines augmentait significativement la concentration de PCSK9 circulante chez l'humain. L'incubation *in vitro* avec de l'ezetimibe ne nous a malheureusement pas permis d'observer ce phénomène dans les lignées cellulaires d'hépatocytes humains HepG2 et de cellules épithéliales intestinales Caco-2. En fait, nous n'avons observé une augmentation de PCSK9 qu'au niveau de l'ARNm (~2 fois le niveau du contrôle, $P < 0,05$) et non au niveau protéique. Toutefois, ces résultats ne comprennent pas la combinaison statine-ezetimibe et devront être répétés. Ceci suggérerait que le mécanisme menant à l'augmentation de PCSK9 au niveau plasmatique serait plus complexe et nécessiterait une étude au niveau de l'organisme global et non simplement au niveau de l'expression cellulaire d'un organe isolé. En effet, l'ezetimibe agit principalement au niveau de l'intestin chez l'humain, et PCSK9 est exprimé principalement dans le foie. Par conséquent, il était peu probable

d'observer un effet significatif au niveau de la sécrétion de PCSK9 par les cellules Caco-2. Une hypothèse pouvant expliquer la hausse de la concentration de PCSK9 plasmatique suite à l'ajout d'ezetimibe chez l'humain serait une diminution de la concentration de cholestérol dans l'hépatocyte, suite à une diminution de l'absorption intestinale de cholestérol. Cette concentration de cholestérol intracellulaire serait plus basse chez un individu sous traitement combiné versus un traitement avec une statine seulement, ce qui induirait l'expression de la PCSK9 d'une manière plus marquée en présence d'un traitement combiné. Il serait intéressant de tenter de vérifier cette hypothèse chez l'animal en mesurant la quantité de cholestérol hépatique et la concentration de PCSK9 plasmatique, dans différentes conditions (véhicule, statine, statine/ezetimibe).

9.1.2. Développement d'un ELISA spécifique à la PCSK9

Suite à la découverte de la PCSK9 et de son rôle dans le métabolisme du cholestérol, il s'avérait important de pouvoir la quantifier au niveau protéique chez l'humain. Benjannet *et al.*⁷¹ ont décelé la présence de la PCSK9 dans le plasma humain par immunoprécipitation, mais la méthode de choix pour quantifier une protéine plasmatique dans plusieurs échantillons est l'ELISA, tel que décrit dans la section 5. Le tableau 8 de la section 5.1 décrit les différentes méthodes de détection de la PCSK9 plasmatique qui ont été développées durant les dernières années. Faute d'anticorps spécifique à la PCSK9 disponible en grande quantité, nous avons produit notre propre anticorps chez le lapin à partir d'une PCSK9 recombinante produite chez l'*Escherichia coli* (*E. coli*). L'anticorps ainsi produit a été purifié par affinité à l'antigène, et il s'est avéré que cet anticorps reconnaissait les deux formes de PCSK9 retrouvées dans le plasma, c'est-à-dire la forme mature d'environ 60 kDa et la forme clivée par la furine d'environ 53 kDa¹⁷⁰. Cette reconnaissance constitue un avantage pour notre test ELISA, car il est le seul à pouvoir quantifier la PCSK9 totale du plasma, tandis que les anticorps utilisés dans les autres techniques de mesure ne reconnaissent que la forme mature. Une partie de cet anticorps a été conjuguée à la peroxydase pour l'utiliser dans la détection, éliminant ainsi une étape du

processus qui pourrait causer un signal non spécifique. De plus, suite à la conjugaison, une étape d'élimination de la peroxydase non liée a été réalisée, toujours pour réduire un possible signal non spécifique. Nous avons également effectué plusieurs tests de validation de l'ELISA pour nous assurer de son efficacité. Nous avons établi une courbe standard linéaire avec des dilutions séquentielles d'un milieu de culture de cellules surexprimant la PCSK9 recombinante humaine ($r^2=0,997$). Ce milieu de culture a été calibré à partir d'une PCSK9 humaine purifiée caractérisée par une analyse quantitative par composition en acides aminés. Nous avons également déterminé les coefficients de variation de la mesure de PCSK9 intra- et inter-essais qui étaient de 1,6% et 7,5%, respectivement. Ces coefficients sont sous les valeurs de variation acceptées pour la mesure de paramètres cliniques qui sont de 10% pour la variation inter-essai. Un test de « *spike-and-recovery* », qui consiste à ajouter une quantité connue d'antigène dans un échantillon et à déterminer la proportion mesurée, a montré une « récupération » moyenne de 92% (n=5). Un test de linéarité d'un échantillon ayant une grande concentration de PCSK9 a montré une variation de 10% sur une série de dilutions de 1 :20 à 1 :80. Finalement, un test de congélation comportant 3 cycles de congélation et décongélation d'un échantillon de plasma a montré une variation de 3% de la concentration mesurée de PCSK9. Cette validation du test ELISA suggère que le test est fiable.

9.1.3. PCSK9 *in vivo*

Notre étude transversale chez 254 volontaires normaux et 200 sujets hypercholestérolémiques traités ou non avec une statine ou une combinaison statine-ezetimibe nous a permis de déterminer plusieurs corrélations. Tel que décrit précédemment, le niveau de PCSK9 plasmatique était corrélé positivement avec l'âge, la concentration de cholestérol total, de LDL-C, de TG et de glucose à jeun. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par les autres groupes^{165,167,168}. De plus, le séquençage de *PCSK9* chez les individus se situant aux extrêmes de la distribution normale de PCSK9 circulante a permis d'identifier une nouvelle variante « perte de fonction », R434W, présentant une basse

concentration de PCSK9 et de LDL-C plasmatiques. Chez les sujets hypercholestérolémiques, la concentration de PCSK9 était plus élevée que chez les sujets sains et augmentée avec une augmentation de la dose de statine, combinée ou non à l'ezetimibe. Chez les patients traités, ceux présentant une hypercholestérolémie familiale (HF) due à une mutation du récepteur LDL avaient des valeurs plus élevées de PCSK9 que les patients non-HF.

Une analyse de la concentration de la PCSK9 plasmatique dans un échantillon représentatif d'enfants et d'adolescents canadiens-français (section 8.2) a montré une association avec l'âge, le sexe et différents paramètres métaboliques, ces associations sont semblables à celles observées chez les adultes. La principale découverte de cette étude a été une association avec l'insulinémie à jeun et avec d'autres paramètres du métabolisme du glucose. Ces associations ont été confirmées dans une étude de la concentration plasmatique de PCSK9 chez 3 138 adultes ¹⁶⁸. Bien que les associations observées dans les études publiées ¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ entre la concentration plasmatique de PCSK9 et les différents paramètres lipidiques et du métabolisme du glucose soient significatives, elles sont modestes, compte tenu de l'effet marqué que l'on peut observer lors de la présence d'une mutation de PCSK9. Lakoski *et al.* ¹⁶⁸ a montré que la variation de la concentration plasmatique de PCSK9 n'expliquait qu'environ 7% de la variation de la concentration de LDL-C. De plus, nous avons montré qu'une variation de 10% de la concentration de PCSK9 n'était associée qu'à une variation de 1,7% du LDL-C dans la cohorte pédiatrique ¹⁶⁹. Ces résultats suggèrent que la concentration plasmatique de PCSK9 ne procure qu'une indication limitée de son activité. Bien entendu, l'étude de telles associations chez l'humain doit tenir compte des nombreuses variations interindividuelles d'origine génétique et environnementale, qui sont moins importantes dans les études chez l'animal et *in vitro*. À défaut de devenir un marqueur clinique que l'on pourrait mesurer de manière routinière, la mesure de la concentration plasmatique de PCSK9 pourrait être utilisée en clinique pour déterminer la cause d'une hypercholestérolémie possible ou pour identifier une éventuelle cause de résistance aux statines.

La régulation conjointe du *LDLR* et de *PCSK9* par le facteur de transcription répondant au cholestérol, SREBP-2, contribuerait vraisemblablement à la corrélation entre *PCSK9* et le LDL-C^{29,30,55}. Des facteurs post-transcriptionnels pourraient aussi contribuer à cette corrélation, car *PCSK9* favorise la dégradation du *LDLR*⁷⁷, causant ainsi une augmentation des concentrations plasmatiques de LDL-C. Cependant, les résultats suggèrent que seulement une partie de la *PCSK9* circulante soit capable de médier la dégradation du *LDLR*. En effet, une étude démontre que seule la *PCSK9* locale et non circulante serait responsable de la régulation des niveaux de *LDLR* hépatiques et de la concentration de cholestérol plasmatique⁴⁹. De plus, les corrélations (r) relativement modestes observées entre *PCSK9* et le LDL-C (r entre 0,24 et 0,35, selon l'étude et la population utilisée) suggèrent que la concentration de *PCSK9* circulante représenterait au mieux une indication limitée de l'activité de *PCSK9*. En fait, parmi les groupes ayant fourni les valeurs de corrélation entre *PCSK9* et le LDL-C (Mayne *et al.*¹⁶⁵, Lakoski *et al.*¹⁶⁸ et Dubuc *et al.*^{165,168,170}), les valeurs de r^2 se situent entre 8% et 12%, ce qui signifierait que la variation de la concentration de la *PCSK9* plasmatique n'expliquerait que de 8 à 12% de la variabilité du LDL-C entre les individus d'une population donnée.

Il est également possible que les corrélations observées entre les concentrations plasmatiques de *PCSK9* et de LDL-C soient dues au fait que ces deux constituants soient épurés de la circulation par la même voie, soit par une liaison au *LDLR*. La suppression génétique du *LDLR* chez la souris double le temps de demi-vie de la *PCSK9* dans la circulation (de 5 minutes à 10 minutes)⁹⁰, suggérant que le *LDLR* contribuerait de façon significative à la clairance de *PCSK9* à cause de la liaison des deux protéines et de la dégradation du complexe au lysosome. Cependant, d'autres mécanismes de clairance de *PCSK9* n'impliquant pas le *LDLR* existent aussi.

Une étude récente a montré par « *fast protein liquid chromatography* » (FPLC; une méthode de chromatographie en phase liquide permettant de séparer en fractions les constituants du plasma selon leur taille) qu'une portion de la *PCSK9* circulante était

localisée dans la même fraction plasmatique que la LDL et la HDL ¹⁷³. Il serait possible que la LDL lie la PCSK9 et en retarde la clairance. Cependant, une autre étude a démontré que les différents allèles de l'*APOE* associés à différentes concentrations de LDL-C n'étaient pas associés aux changements de concentration de PCSK9 ¹⁶⁸. Ces résultats ne concordent donc pas avec l'hypothèse d'une interaction directe entre les concentrations circulantes de LDL-C et de PCSK9.

Finalement, même si la concentration de PCSK9 ne semble pas reliée de façon importante à la concentration de LDL-C, les résultats obtenus chez les patients HF et non-HF sous différents traitements signifient que la mesure de la PCSK9 circulante pourrait servir à surveiller la réponse à la thérapie, en plus de la mesure du LDL-C, dans un large éventail de patients, afin de déterminer une possible cause de résistance au traitement suite à une augmentation de la PCSK9 plasmatique.

9.2. Importance du diagnostic pour offrir un traitement approprié

Le rôle de la PCSK9 dans le métabolisme du LDL est d'une grande importance, et l'identification de mutations « gain de fonction » par séquençage devient importante dans les cas d'ADH lorsque l'implication du LDLR et de l'apoB est exclue. Il est également important d'étudier la fréquence des mutations « perte de fonction » de PCSK9, car les variations génétiques sont réparties tout au long des 12 exons du gène et leur fréquence varie selon les populations. L'exemple des descendants africains est très révélateur, présentant une fréquence de 2,6% de mutations non-sens dans la cohorte de l'étude ARIC (*Atherosclerosis Risk in Communities*) ¹⁵⁶. Il est donc important d'évaluer la fréquence de nouvelles variantes de PCSK9 et d'étudier la ségrégation avec le phénotype dans la famille pour vérifier la causalité de l'ADH. Les multiples variations non-synonymes de PCSK9, plus de 40, causent des modifications des concentrations de LDL-C dans la population générale. Même si le gène *PCSK9* n'est relié qu'à 2% des cas d'ADH, les variations

positives ou négatives de LDL-C causées par une variation génétique de *PCSK9* sont plus fréquentes et plus importantes que celles causées par certains polymorphismes du LDLR ou de l'apoB. L'effet de chaque variant de PCSK9 est peut-être peu élevé, mais leur effet cumulatif pourrait influencer significativement la variabilité des taux de cholestérol et la susceptibilité aux maladies cardiovasculaires.

De plus, une investigation plus poussée serait nécessaire pour déterminer si les mutations « gain de fonction » de PCSK9 n'auraient pas d'autres effets athérogènes en plus d'une augmentation du LDL-C, comme une augmentation de la concentration plasmatique de TG. PCSK9 pourrait peut-être exercer un effet toxique direct sur la paroi artérielle, effet qui serait réduit par les variantes « perte de fonction » qui protégeraient contre l'athérosclérose^{50,159}.

La découverte de l'implication de PCSK9, et surtout de ses variantes « perte de fonction », dans la régulation des concentrations de LDL-C et de la maladie cardiovasculaire a été cruciale pour la mise en évidence d'une réduction précoce du cholestérol dans la prévention de la maladie. Comme nous en avons discuté plus tôt, les individus ayant une mutation « perte de fonction » de PCSK9 ont eu une faible concentration de LDL-C tout au long de leur vie (plus de 1,03 mmol/L plus bas que les sujets contrôles de l'étude), réduisant ainsi l'incidence de maladie cardiovasculaire de 88%¹⁵⁶. Par contre, une réduction similaire (-1 mmol/L du LDL-C) atteinte par un traitement de 5 ans par une statine ne diminue le risque cardiovasculaire que de 23% en moyenne. Ceci démontre qu'il est important de mettre l'emphase sur la réduction du LDL-C le plus tôt possible au cours de la vie, bien avant les premiers signes d'athérosclérose avancée, pour atteindre une réduction significative de l'incidence de maladie cardiovasculaire¹⁵⁹.

Cependant, certains groupes avaient émis l'hypothèse qu'un taux trop bas de cholestérol pouvait augmenter l'incidence de cancer. Dans cette optique, une étude prospective a analysé l'association des variations Y142X, C679X et R46L de PCSK9 avec l'incidence de cancer entre 1987 et 2000. La fréquence des variantes de PCSK9 étudiés

était de 2,4% chez les Noirs (Y142X et C679X) et de 3,2% chez les Blancs (R46L). Aucun variant n'était associé à une augmentation de l'incidence de cancer. De faibles concentrations de cholestérol total ou de LDL-C n'étaient pas non plus significativement associés à l'incidence de cancer, suggérant qu'une basse concentration de cholestérol à long terme, comme chez les porteurs des mutations Y142X, C679X et R46L de PCSK9, n'augmente pas le risque de cancer¹⁷⁴.

9.3. Études cliniques sur un « anti-PCSK9 »

L'utilisation des statines représente le traitement le plus prescrit au monde en prévention primaire et secondaire contre la maladie coronarienne, mais la thérapie actuelle avec les statines a mis en évidence une réponse limitée en termes de réduction des concentrations de LDL-C (40-50%) et du risque cardiovasculaire¹⁷⁵. Comme nous l'avons montré dans notre premier article²⁹, les statines induisent simultanément l'expression du LDLR et de PCSK9 *via* la voie du SREBP-2. Nous avons également montré que l'induction de PCSK9 était plus importante que celle du LDLR, ce qui pourrait suggérer que les statines n'ont pas un effet optimal sur la réduction du LDL-C. En effet, l'action des statines pourrait être atténuée par une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de PCSK9, et de la destruction d'une partie des LDLR, réduisant ainsi l'effet des statines sur la réduction des concentrations plasmatiques de LDL-C.

L'information provenant d'animaux déficients en PCSK9 démontre que l'inhibition de l'expression de PCSK9 serait une stratégie efficace pour réduire les concentrations plasmatiques de LDL-C. De plus, l'observation que des individus présentant une variation « perte de fonction » de PCSK9 montrent une réponse accrue aux statines renforce cette hypothèse¹⁵² et suggère que PCSK9 pourrait être une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de l'hypercholestérolémie.

Plusieurs stratégies pour bloquer la synthèse et l'activité de PCSK9 ont été mises au point, incluant les oligonucléotides anti-sens, l'interférence de l'ARN (siRNA) et les anticorps neutralisants. Les premiers résultats chez les animaux ont démontré une réduction de 38% et de 50-60% du LDL-C par l'administration d'oligonucléotides anti-sens chez la souris et l'utilisation de l'interférence ARN chez le primate, respectivement^{54,134}.

Plus récemment, l'utilisation d'un anticorps monoclonal contre la PCSK9 humaine, capable de se lier à la PCSK9 et de prévenir son interaction avec le LDLR, eut pour résultat une réduction significative du cholestérol total chez la souris (25%) et du LDL-cholestérol chez des primates non-humains (80% après 10 jours). De plus, une combinaison de cet anticorps avec une statine avait un effet additif sur l'augmentation de l'expression du LDLR dans les cellules HepG2, suggérant encore une fois que l'inhibition de PCSK9 peut améliorer l'efficacité des statines¹³⁵.

Ces découvertes offrent la possibilité d'un nouveau traitement pouvant être administré à des patients souffrant d'hypercholestérolémie sévère ne répondant pas aux statines ou en combinaison avec une statine chez des patients ne pouvant être traités adéquatement avec une statine seule. Cependant, ces traitements doivent être administrés par injection, ce qui pourrait limiter leur utilité thérapeutique. Des études cliniques seront donc nécessaires pour évaluer leur portée chez l'humain.

9.4. Hypocholestérolémie causée par une déficience en PCSK9

L'hypocholestérolémie due à une déficience en PCSK9 peut paraître bénigne par rapport à d'autres formes d'hypocholestérolémie sévère comme l'abétalipoprotéïnémie (déficience en MTP) et l'hypobétalipoprotéïnémie homozygote (déficience en apoB), qui sont associées à une malnutrition, une stéatose hépatique, une stéatorrhée, et une manifestation de déficience en vitamines liposolubles⁷⁸. Cependant, les individus porteurs de deux mutations « perte de fonction » de PCSK9 (*compound heterozygote*) semblent en

bonne santé et ont une longévité normale ^{78,106}. Jusqu'à maintenant, une déficience en PCSK9 ne semble affecter que la concentration de cholestérol chez l'humain et la souris ⁵³, tandis qu'une telle déficience chez le poisson zèbre cause un désordre dans le développement neuronal et la mort des embryons ¹⁷⁶. En plus d'être produit majoritairement par le foie, PCSK9 est aussi exprimé dans l'intestin, le système nerveux central et le rein. Cependant, l'analyse de la déficience en PCSK9 hépatique chez la souris a démontré que la PCSK9 circulante était d'origine hépatique et quelle agissait localement, suggérant que les autres sites d'expression ne contribuent pas significativement à la concentration de PCSK9 plasmatique ⁴⁹. D'autres maladies associées à des mutations de PCSK9 pourraient être encore inconnues à ce jour ⁵⁰.

Une étude récente a notamment démontré que les souris mâles déficientes en PCSK9 présentaient une légère hyperglycémie chronique et une tolérance abaissée au glucose avec le vieillissement ¹⁷⁷. Le contenu pancréatique en insuline et la concentration plasmatique d'insuline étaient réduits chez ces souris, suggérant une insuffisance insulinémique. De plus, les îlots pancréatiques montraient des anomalies morphologiques, des signes d'inflammation et une apoptose précoce. Ces anomalies pourraient être causées par une accumulation de cholestérol dans les îlots qui peut s'avérer toxique pour les cellules β ^{178,179}. Cette accumulation de cholestérol serait une conséquence logique du manque de régulation à la baisse du LDLR par PCSK9 et d'un trop grand apport de LDL-C *via* ce récepteur. Ces résultats suggèrent donc que, chez la souris, une déficience totale en PCSK9 pourrait affecter l'homéostasie du glucose.

Par contre, en comparant des souris sauvages à des souris déficientes en PCSK9 lors de la régénération hépatique suite à une hépatectomie partielle, il s'est avéré que PCSK9 était nécessaire pour une bonne guérison et une régénération efficace ⁴⁹. En effet, après la chirurgie, toutes les souris sauvages ainsi que celles hétérozygotes étaient en bonne santé, tandis que celles déficientes en PCSK9 étaient faibles, leur foie était plus petit et parsemé de lésions nécrotiques. Quatre souris sur 22, déficientes en PCSK9 sont décédées.

Toutefois, une diète riche en cholestérol prévenait les lésions nécrotiques. Le mécanisme provoquant ces lésions reste méconnu, mais une faible concentration de cholestérol plasmatique semble être un facteur déterminant.

PCSK9 serait tout de même vue comme une cible thérapeutique sécuritaire, en considérant l'état de santé satisfaisant de deux femmes sans PCSK9 fonctionnelle^{78,151} et le fait que les souris hétérozygotes ont eu une régénération hépatique efficace⁴⁹. Cependant, les résultats obtenus à partir de l'hépatectomie chez la souris pourraient soulever une préoccupation concernant les possibles donneurs de foie humains qui présentent une hypocholestérolémie. Advenant que cette condition soit causée par une mutation « perte de fonction » de PCSK9, la régénération hépatique pourrait être compromise et une diète riche en cholestérol pourrait être requise afin de contrer les possibles conséquences néfastes⁴⁹.

9.5. Perspectives : Rôle potentiel de PCSK9 dans l'hépatite C et le diabète

9.5.1. Hépatite C

Le virus de l'hépatite C (HCV) est la principale cause d'hépatite chronique, de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire chez l'humain¹⁸⁰. L'entrée du virus à l'intérieur de la principale cellule cible, l'hépatocyte, n'est pas encore bien comprise, mais elle semble impliquer plusieurs récepteurs membranaires dont le CD81, le SR-B1, le LDLR et les récepteurs claudin-1, claudin-6, claudin-9 et l'occludine¹⁸¹. Comme la majorité du virus circule dans le plasma sous forme de lipoviroparticules enrobées d'apoE et d'apoB et semble être associé au VLDL^{182,183} et comme le LDLR lie et internalise les lipoprotéines contenant l'apoE et l'apoB, le LDLR et PCSK9 pourraient jouer un rôle important dans l'entrée du HCV *in vivo*. Labonté *et al.* ont examiné l'effet de PCSK9 sur l'infection de cellules Huh7 par le HCV¹⁸¹. Il s'est avéré que PCSK9 pouvait réduire le niveau du récepteur CD81 sur la surface cellulaire, en plus du LDLR. La réduction du niveau de ces

deux récepteurs sur la surface des cellules Huh7 par PCSK9 avait un effet direct sur leur susceptibilité à l'infection par le HCV. De plus, l'incubation des cellules Huh7 avec des doses croissantes de PCSK9 soluble a montré que PCSK9 était capable de bloquer l'infection au HCV de manière dose-dépendante.

Il est donc tentant d'envisager, qu'en transposant aux humains, une concentration et/ou une activité élevée de la PCSK9 plasmatique due à une mutation « gain de fonction » pourrait moduler la susceptibilité du foie à une infection par le HCV ¹⁸¹. Il a également été observé que le récepteur CD81 était régulé à la baisse chez les souris *Pcsk9*^{-/-}, suggérant que PCSK9 représenterait une cible antivirale importante qui reste à être confirmée chez l'humain. De plus, une étude a montré qu'une concentration élevée de LDL-C plasmatique chez les patients atteints d'hépatite C serait associée à une meilleure réponse au traitement ¹⁸⁴. Par conséquent, une concentration élevée de PCSK9, corrélée au niveau de LDL-C, pourrait possiblement chez certains sujets contribuer à limiter l'infection du foie par le virus. Il serait très intéressant de mesurer les concentrations de PCSK9 plasmatique par ELISA chez les répondeurs au traitement de l'hépatite C afin de déterminer une possible corrélation entre les concentrations plasmatiques de PCSK9 et le degré de réponse à la médication antivirale. La mesure de la PCSK9 plasmatique chez les individus infectés pourrait donc aider à raffiner les stratégies cliniques et médicamenteuses pour traiter les infections à l'HCV.

9.5.2. Diabète

Plusieurs études observationnelles ont montré que la concentration plasmatique de PCSK9 était corrélée positivement avec plusieurs paramètres métaboliques comme la glycémie à jeun, l'insulinémie et le HOMA-IR chez l'adulte de même que chez un échantillon représentatif d'enfants et d'adolescents (section 8.2) ^{168,169}. Des études faites chez les rongeurs ont déjà démontré l'importance de l'insuline dans la régulation de PCSK9 ⁶¹⁻⁶³. L'induction du diabète de type I chez le rat par injection de streptozotocine cause une

réduction marquée de l'expression de la PCSK9 hépatique chez les rats hypoinsulinémiques⁶². Des résultats supplémentaires proviennent d'études d'hyperinsulinémie chez la souris et le rat⁶¹. Un clamp euglycémique-hyperinsulinémique a augmenté l'expression de l'ARNm de PCSK9 chez le rat, et cette augmentation se produirait *via* l'action de l'insuline sur SREBP-1c, qui régulerait la transcription de PCSK9. Inversement, le glucose n'avait aucun effet sur l'ARNm de PCSK9 dans des hépatocytes de souris en culture primaire. Finalement, une administration sous-cutanée de glucagon chez le rat a montré une réduction de 70% de l'expression de PCSK9, tandis qu'une administration d'insuline augmentait significativement l'expression l'ARNm de PCSK9⁶³.

Nous avons débuté un projet sur l'effet de l'insuline *in vitro* et *in vivo* chez l'humain et avons obtenus des résultats préliminaires forts intéressants. Les études cellulaires ont été effectuées dans les cellules HepG2 et Huh7, deux lignées bien connues d'hépatocytes humains. L'incubation de ces cellules avec de l'insuline a réduit significativement le niveau d'ARNm de PCSK9 ainsi que la concentration intracellulaire de PCSK9. Ces résultats contredisent ce qui a déjà été démontré chez les rongeurs. Donc, la PCSK9 humaine et celle de souris ne semblent pas avoir le même modèle de régulation. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. Plusieurs gènes sont sous le contrôle négatif de l'insuline dont le gène de la HNF-4 α , de la 7 α -hydroxylase du cholestérol et de la protéine de transfert microsomial (MTP)¹⁸⁵. Les principaux facteurs de transcription induits par l'insuline sont : Foxo, SREBP et Sp1. La PCSK9 a des sites de liaison dans son promoteur pour SREBP et Sp1^{29,69}, il serait donc intéressant d'analyser comment ces facteurs de transcription interagissent pour activer ou réprimer la transcription de PCSK9. Nous avons également eu accès à des plasmas d'individus ayant subi un clamp euglycémique-hyperinsulinémique. Ces résultats ont démontré qu'une élévation aigüe de l'insuline était associée à une réduction aigüe de la PCSK9 plasmatique de 16% (résultats non publiés). Les mécanismes causant cette réduction sont encore méconnus. Une investigation plus poussée s'avérera nécessaire pour déterminer s'il y a réellement un lien entre la

concentration de PCSK9 et la résistance à l'insuline et le diabète chez l'humain, ainsi que les mécanismes impliqués.

Conclusion

La découverte des premières mutations naturelles de PCSK9 a révélé l'implication de cet important joueur, jusqu'alors inconnu, dans l'homéostasie du cholestérol. Les nombreux résultats obtenus rapidement par un bon nombre d'équipes de recherche à travers le monde ont permis d'élucider le rôle physiologique et pathogénique de PCSK9 dans le métabolisme du cholestérol. Plus précisément, la mesure de la concentration plasmatique de PCSK9 pourra aider à mieux cerner le rôle de PCSK9 dans plusieurs maladies, notamment l'hypercholestérolémie, mais aussi le diabète et l'hépatite C. La mesure de la concentration plasmatique de PCSK9 pourrait également être cliniquement pertinente pour évaluer l'effet des médicaments hypolipémiants et identifier de nouvelles variantes. Cependant, une méthode standardisée, avec des anticorps spécifiques, sera nécessaire pour comparer les concentrations plasmatiques de PCSK9 mesurées dans différentes études, ainsi que les concentrations de PCSK9 clivée par la furine et/ou autres protéases. De plus, une méthode de mesure standardisée sera de première importance pour évaluer l'efficacité *in vivo* des approches de réduction de l'expression et/ou de l'activité de PCSK9 citées précédemment, et possiblement pour tester l'effet de la nutrition et l'usage de divers produits, comme la berberine ou les fibrates, sur l'expression de PCSK9.

La découverte du rôle de PCSK9 permettra donc de mieux comprendre la physiopathologie de l'ADH et de la maladie cardiovasculaire. L'aspect le plus important de cette découverte est sûrement la venue d'une nouvelle approche pour réduire les concentrations de cholestérol plasmatique en tentant d'inhiber l'action de la PCSK9 sur le LDLR dans le but d'améliorer l'efficacité des traitements hypolipémiants.

Bibliographie

1. Canada Adlspd. Principales causes de décès, Canada, 2004, hommes et femmes confondus., 2008.
2. Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. Fat transport in lipoproteins--an integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med.* 1967 Feb 2;276(5):273-81 concl.
3. Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial Hypercholesterolemia. In: D. V, C.R. S, A.L. B, al e (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* Volume 2. New York: McGraw-Hill, Inc., 2001:2863-913.
4. Garcia CK, Wilund K, Arca M, et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science.* 2001 May 18;292(5520):1394-8.
5. The statin effects study. Available from: <https://www.statineeffects.com/info/>, 2008.
6. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003 Jun;34(2):154-6.
7. Gagné C, Gaudet D. *Les dyslipoprotéïnémies: l'approche clinique.* 3e ed: Lipimed Communications, 2007:305.
8. Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RW, Jr., Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int J Biol Sci.* 2009;5(5):474-88.
9. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986 Apr 4;232(4746):34-47.
10. Jeon H, Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:535-62.
11. Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 1977;46:897-930.
12. 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.

13. Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet.* 1990;24:133-70.
14. Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973 Oct;70(10):2804-8.
15. Brown MS, Dana SE, Goldstein JL. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 1974 Feb 10;249(3):789-96.
16. 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.* 1974 Mar;71(3):788-92.
17. Goldstein JL, Brown MS. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 1974 Aug 25;249(16):5153-62.
18. Russell DW, Schneider WJ, Yamamoto T, Luskey KL, Brown MS, Goldstein JL. Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell.* 1984 Jun;37(2):577-85.
19. Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, et al. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell.* 1984 Nov;39(1):27-38.
20. Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science.* 1985 May 17;228(4701):815-22.
21. Sudhof TC, Russell DW, Goldstein JL, Brown MS, Sanchez-Pescador R, Bell GI. Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF precursor. *Science.* 1985 May 17;228(4701):893-5.

22. Innerarity TL, Mahley RW. Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. *Biochemistry (Mosc)*. 1978 Apr 18;17(8):1440-7.
23. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Role of lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. *J Biol Chem*. 1978 Dec 25;253(24):9053-62.
24. Davis CG, Lehrman MA, Russell DW, Anderson RG, Brown MS, Goldstein JL. The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell*. 1986 Apr 11;45(1):15-24.
25. Bu G. The roles of receptor-associated protein (RAP) as a molecular chaperone for members of the LDL receptor family. *Int Rev Cytol*. 2001;209:79-116.
26. Hussain MM, Strickland DK, Bakillah A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:141-72.
27. Springer TA. An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *J Mol Biol*. 1998 Nov 6;283(4):837-62.
28. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002 May;109(9):1125-31.
29. 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*. 2004 Aug;24(8):1454-9.
30. Jeong HJ, Lee HS, Kim KS, Kim YK, Yoon D, Park SW. Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *J Lipid Res*. 2008 Feb;49(2):399-409.
31. Foufelle F, Hegarty B, Bobard A, Hainault I, Bossard P, Ferre P. [A new role for insulin in the control of energetic metabolism in liver]. *Med Sci (Paris)*. 2005 Jun-Jul;21(6-7):569-71.

32. Kong WJ, Liu J, Jiang JD. Human low-density lipoprotein receptor gene and its regulation. *J Mol Med*. 2006 Jan;84(1):29-36.
33. Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature*. 1979 Jun 21;279(5715):679-85.
34. Brown MS, Anderson RG, Goldstein JL. Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell*. 1983 Mar;32(3):663-7.
35. Basu SK, Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS. Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblasts. *Cell*. 1981 May;24(2):493-502.
36. Goldstein JL, Dana SE, Faust JR, Beaudet AL, Brown MS. Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *J Biol Chem*. 1975 Nov 10;250(21):8487-95.
37. Brown MS, Faust JR, Goldstein JL. Role of the low density lipoprotein receptor in regulating the content of free and esterified cholesterol in human fibroblasts. *J Clin Invest*. 1975 Apr;55(4):783-93.
38. Seidah NG, Chretien M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res*. 1999 Nov 27;848(1-2):45-62.
39. 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*. 1999 Feb 16;96(4):1321-6.
40. 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*. 2003 Feb 4;100(3):928-33.
41. 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*. 2004 Nov 19;279(47):48865-75.

42. Varret M, Rabes JP, Saint-Jore B, et al. A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32. *Am J Hum Genet.* 1999 May;64(5):1378-87.
43. Hunt SC, Hopkins PN, Bulka K, et al. Genetic localization to chromosome 1p32 of the third locus for familial hypercholesterolemia in a Utah kindred. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Apr;20(4):1089-93.
44. Naureckiene S, Ma L, Sreekumar K, et al. Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch Biochem Biophys.* 2003 Dec 1;420(1):55-67.
45. 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. *The FEBS journal.* 2008 Jul;275(13):3480-93.
46. Moore KL. The biology and enzymology of protein tyrosine O-sulfation. *J Biol Chem.* 2003 Jul 4;278(27):24243-6.
47. Seidah NG, Prat A. The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med.* 2007 Jul;85(7):685-96.
48. Basak A. Inhibitors of proprotein convertases. *J Mol Med.* 2005 Nov;83(11):844-55.
49. 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.* 2008 Aug;48(2):646-54.
50. Abifadel M, Rabes JP, Devillers M, et al. Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) gene in cholesterol metabolism and disease. *Hum Mutat.* 2009 Apr;30(4):520-9.
51. 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.* 2004 May 4;101(18):7100-5.
52. 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.* 2004 Nov 26;279(48):50630-8.

53. 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*. 2005 Apr 12;102(15):5374-9.
54. Graham MJ, Lemonidis KM, Whipple CP, et al. Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J Lipid Res*. 2007 Apr;48(4):763-7.
55. 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*. 2003 Oct 14;100(21):12027-32.
56. 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*. 2003 Nov;44(11):2109-19.
57. Dubuc G, Tremblay M, Pare G, et al. A new method for measurement of total plasma PCSK9: clinical applications. *J Lipid Res*. Jan;51(1):140-9.
58. 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*. 2008 Feb;49(2):394-8.
59. Mayne J, Dewpura T, Raymond A, et al. Plasma PCSK9 levels are significantly modified by statins and fibrates in humans. *Lipids in health and disease*. 2008;7:22.
60. 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*. 2009 Apr;296(4):G805-15.
61. 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*. 2006 Mar 10;281(10):6211-8.
62. Niesen M, Bedi M, Lopez D. Diabetes alters LDL receptor and PCSK9 expression in rat liver. *Arch Biochem Biophys*. 2008 Feb 15;470(2):111-5.
63. Persson L, Galman C, Angelin B, Rudling M. Importance of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in the hormonal and dietary regulation of rat liver low-density lipoprotein receptors. *Endocrinology*. 2009 Mar;150(3):1140-6.

64. Langhi C, Le May C, Kourimate S, et al. Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 2008 Mar 19;582(6):949-55.
65. 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.* 2006 Oct;147(10):4985-95.
66. 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.* 2008 Apr 11;283(15):9666-73.
67. Troutt JS, Alborn WE, Cao G, Konrad RJ. Fenofibrate treatment increases human serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 levels. *J Lipid Res.* Feb;51(2):345-51.
68. Troutt JS, Alborn WE, Cao G, Konrad RJ. Fenofibrate treatment increases human serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 levels. *J Lipid Res.* 2010 Feb;51(2):345-51.
69. 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.* 2009 Oct 16;284(42):28885-95.
70. 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.* Jan 4.
71. 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.* 2006 Oct 13;281(41):30561-72.
72. 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.* 2008 Jan 25;283(4):2373-84.

73. 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.* 2007 Jun 22;282(25):18602-12.
74. 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.* 2007 Jul 20;282(29):20799-803.
75. Li J, Tumanut C, Gavigan JA, et al. Secreted PCSK9 promotes LDL receptor degradation independently of proteolytic activity. *Biochem J.* 2007 Sep 1;406(2):203-7.
76. Fan D, Yancey PG, Qiu S, et al. Self-association of human PCSK9 correlates with its LDLR-degrading activity. *Biochemistry (Mosc).* 2008 Feb 12;47(6):1631-9.
77. 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.* 2006 Nov;116(11):2995-3005.
78. 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.* 2006 Sep;79(3):514-23.
79. 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.* 2007 May;14(5):413-9.
80. Piper DE, Jackson S, Liu Q, et al. The crystal structure of PCSK9: a regulator of plasma LDL-cholesterol. *Structure.* 2007 May;15(5):545-52.
81. 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.* 2008 Feb 12;105(6):1820-5.
82. Fisher TS, Lo Surdo P, Pandit S, et al. Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation. *J Biol Chem.* 2007 Jul 13;282(28):20502-12.

83. 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*. 2008 Sep 2;105(35):13045-50.
84. 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*. 2008 Jan 25;283(4):2363-72.
85. Stolt PC, Bock HH. Modulation of lipoprotein receptor functions by intracellular adaptor proteins. *Cell Signal*. 2006 Oct;18(10):1560-71.
86. 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*. 2008 Oct 10;375(1):69-73.
87. Ullman EF, Kirakossian H, Singh S, et al. Luminescent oxygen channeling immunoassay: measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 7;91(12):5426-30.
88. 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*. 2008 Nov 14;283(46):31791-801.
89. Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Jun;6(6):449-61.
90. Grefhorst A, McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. *J Lipid Res*. 2008 Jun;49(6):1303-11.
91. Cameron J, Holla OL, Ranheim T, Kulseth MA, Berge KE, Leren TP. Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum Mol Genet*. 2006 May 1;15(9):1551-8.
92. Qian YW, Schmidt RJ, Zhang Y, et al. Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. *J Lipid Res*. 2007 Jul;48(7):1488-98.
93. Nassoury N, Blasiola DA, Tebon Oler A, et al. The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic*. 2007 Jun;8(6):718-32.

94. 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*. 2009 Oct 16;284(42):28856-64.
95. 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*. 1987 Sep 17;317(12):734-7.
96. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review. *Am J Epidemiol*. 2004 Sep 1;160(5):421-9.
97. Gagne C, Moorjani S, Brun D, Toussaint M, Lupien PJ. Heterozygous familial hypercholesterolemia. Relationship between plasma lipids, lipoproteins, clinical manifestations and ischaemic heart disease in men and women. *Atherosclerosis*. 1979 Sep;34(1):13-24.
98. DoNDP, familial hypercholesterolaemia: report of a second WHO Consultation. Geneva: WHO, 1999.
99. Davignon J, Dufour R. Primary Hyperlipidemias. Oxford: Clinical Publishing; 2007. 142 p.
100. Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC, et al. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol*. 1993 Jul 15;72(2):171-6.
101. Langer T, Strober W, Levy RI. The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest*. 1972 Jun;51(6):1528-36.
102. Goldstein JL, Brown MS. Familial Hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. 8th ed. Volume II. New York: McGraw-Hill, 2001:2863-913.
103. Hoseki J, Ushioda R, Nagata K. Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biochem*. Jan;147(1):19-25.
104. Moorjani S, Roy M, Torres A, et al. Mutations of low-density-lipoprotein-receptor gene, variation in plasma cholesterol, and expression of coronary heart disease in

- homozygous familial hypercholesterolaemia. *Lancet*. 1993 May 22;341(8856):1303-6.
105. Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res*. 1990 Aug;31(8):1337-49.
 106. 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*. 2005 Feb;37(2):161-5.
 107. Sakai J, Rawson RB. The sterol regulatory element-binding protein pathway: control of lipid homeostasis through regulated intracellular transport. *Curr Opin Lipidol*. 2001 Jun;12(3):261-6.
 108. Duriez P. [Mechanisms of actions of statins and fibrates]. *Therapie*. 2003 Jan-Feb;58(1):5-14.
 109. Sposito AC, Chapman MJ. Statin therapy in acute coronary syndromes: mechanistic insight into clinical benefit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Oct 1;22(10):1524-34.
 110. Albers-Schonberg G, Joshua H, Lopez MB, et al. Dihydromevinolin, a potent hypocholesterolemic metabolite produced by *Aspergillus terreus*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1981 May;34(5):507-12.
 111. Alberts AW. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am J Cardiol*. 1988 Nov 11;62(15):10J-5J.
 112. 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*. 2002 Aug;10(2):237-45.
 113. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Jul 26;1302(2):93-109.
 114. Malmendier CL, Delcroix C. Effects of fenofibrate on high and low density lipoprotein metabolism in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1985 May;55(2):161-9.

115. Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, et al. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 7;102(23):8132-7.
116. Temel RE, Tang W, Ma Y, et al. Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *J Clin Invest*. 2007 Jul;117(7):1968-78.
117. van Heek M, Farley C, Compton DS, et al. Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663. *Br J Pharmacol*. 2000 Apr;129(8):1748-54.
118. van Heek M, Farley C, Compton DS, Hoos L, Davis HR. Ezetimibe selectively inhibits intestinal cholesterol absorption in rodents in the presence and absence of exocrine pancreatic function. *Br J Pharmacol*. 2001 Sep;134(2):409-17.
119. Sudhop T, Lutjohann D, Kodal A, et al. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation*. 2002 Oct 8;106(15):1943-8.
120. Ganji SH, Kamanna VS, Kashyap ML. Niacin and cholesterol: role in cardiovascular disease (review). *J Nutr Biochem*. 2003 Jun;14(6):298-305.
121. Einarsson K, Ericsson S, Ewerth S, et al. Bile acid sequestrants: mechanisms of action on bile acid and cholesterol metabolism. *Eur J Clin Pharmacol*. 1991;40 Suppl 1:S53-8.
122. Plat J, Mensink RP. Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *Am J Cardiol*. 2005 Jul 4;96(1A):15D-22D.
123. Insull W, Jr., Toth P, Mullican W, et al. Effectiveness of colestevlam hydrochloride in decreasing LDL cholesterol in patients with primary hypercholesterolemia: a 24-week randomized controlled trial. *Mayo Clin Proc*. 2001 Oct;76(10):971-82.
124. Plat J, van Onselen EN, van Heugten MM, Mensink RP. Effects on serum lipids, lipoproteins and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters. *Eur J Clin Nutr*. 2000 Sep;54(9):671-7.
125. Aragane K, Kojima K, Fujinami K, Kamei J, Kusunoki J. Effect of F-1394, an acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor, on atherosclerosis induced by high cholesterol diet in rabbits. *Atherosclerosis*. 2001 Sep;158(1):139-45.

126. Tardif JC, Gregoire J, L'Allier PL, et al. Effects of the acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase inhibitor avasimibe on human atherosclerotic lesions. *Circulation*. 2004 Nov 23;110(21):3372-7.
127. Nissen SE, Tuzcu EM, Brewer HB, et al. Effect of ACAT inhibition on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2006 Mar 23;354(12):1253-63.
128. Cuchel M, Bloedon LT, Szapary PO, et al. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 2007 Jan 11;356(2):148-56.
129. Samaha FF, McKenney J, Bloedon LT, Sasiela WJ, Rader DJ. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein alone or with ezetimibe in patients with moderate hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008 Aug;5(8):497-505.
130. Davidson MH. Novel nonstatin strategies to lower low-density lipoprotein cholesterol. *Current atherosclerosis reports*. 2009 Jan;11(1):67-70.
131. Flint OP, Masters BA, Gregg RE, Durham SK. Inhibition of cholesterol synthesis by squalene synthase inhibitors does not induce myotoxicity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997 Jul;145(1):91-8.
132. Nishimoto T, Amano Y, Tozawa R, et al. Lipid-lowering properties of TAK-475, a squalene synthase inhibitor, in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol*. 2003 Jul;139(5):911-8.
133. Kastelein JJ, Wedel MK, Baker BF, et al. Potent reduction of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol by short-term administration of an antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Circulation*. 2006 Oct 17;114(16):1729-35.
134. 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*. 2008 Aug 19;105(33):11915-20.
135. 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*. 2009 Jun 16;106(24):9820-5.

136. Seidah NG. PCSK9 as a therapeutic target of dyslipidemia. Expert opinion on therapeutic targets. 2009 Jan;13(1):19-28.
137. Elmen J, Lindow M, Schutz S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. Nature. 2008 Apr 17;452(7189):896-9.
138. Elmen J, Lindow M, Silahtaroglu A, et al. Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. Nucleic Acids Res. 2008 Mar;36(4):1153-62.
139. Gupta N, Fisker N, Asselin M-C, et al. A locked nucleic acid antisense oligonucleotide (LNA) silences PCSK9 and enhances LDLR expression *in vitro* and *in vivo*. PLoS ONE. 2010;in press.
140. 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. 2005 Jun;46(6):1312-9.
141. 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. 2005 Feb 8;102(6):2069-74.
142. Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. Trends Biochem Sci. 2007 Feb;32(2):71-7.
143. Naoumova RP, Tosi I, Patel D, et al. Severe hypercholesterolemia in four British families with the D374Y mutation in the PCSK9 gene: long-term follow-up and treatment response. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Dec;25(12):2654-60.
144. Pisciotta L, Priore Oliva C, Cefalu AB, et al. Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis. 2006 Jun;186(2):433-40.
145. Timms KM, Wagner S, Samuels ME, et al. A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. Hum Genet. 2004 Mar;114(4):349-53.
146. Haddad L, Day IN, Hunt S, Williams RR, Humphries SE, Hopkins PN. Evidence for a third genetic locus causing familial hypercholesterolemia. A non-LDLR, non-APOB kindred. J Lipid Res. 1999 Jun;40(6):1113-22.

147. Leren TP. Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet*. 2004 May;65(5):419-22.
148. Allard D, Amsellem S, Abifadel M, et al. Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum Mutat*. 2005 Nov;26(5):497.
149. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation*. 2004 Jul 13;110(2):227-39.
150. Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, et al. A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Hum Genet*. 2006 Mar;78(3):410-22.
151. 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*. 2007 Aug;193(2):445-8.
152. 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*. 2006 May;26(5):1094-100.
153. Fasano T, Cefalu AB, Di Leo E, et al. A novel loss of function mutation of PCSK9 gene in white subjects with low-plasma low-density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Mar;27(3):677-81.
154. Scartezini M, Hubbart C, Whittall RA, Cooper JA, Neil AH, Humphries SE. The PCSK9 gene R46L variant is associated with lower plasma lipid levels and cardiovascular risk in healthy U.K. men. *Clin Sci (Lond)*. 2007 Dec;113(11):435-41.
155. Miyake Y, Kimura R, Kokubo Y, et al. Genetic variants in PCSK9 in the Japanese population: rare genetic variants in PCSK9 might collectively contribute to plasma LDL cholesterol levels in the general population. *Atherosclerosis*. 2008 Jan;196(1):29-36.

156. 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*. 2006 Mar 23;354(12):1264-72.
157. Kane JP, Havel RJ. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. Volume II. New York: McGraw Hill, 2001:2717-52.
158. Cariou B, Ouguerram K, Zair Y, et al. PCSK9 Dominant Negative Mutant Results in Increased LDL Catabolic Rate and Familial Hypobetalipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Sep 17.
159. Brown MS, Goldstein JL. *Biomedicine*. Lowering LDL--not only how low, but how long? *Science*. 2006 Mar 24;311(5768):1721-3.
160. Chen SN, Ballantyne CM, Gotto AM, Jr., Tan Y, Willerson JT, Marian AJ. A common PCSK9 haplotype, encompassing the E670G coding single nucleotide polymorphism, is a novel genetic marker for plasma low-density lipoprotein cholesterol levels and severity of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2005 May 17;45(10):1611-9.
161. Evans D, Beil FU. The E670G SNP in the PCSK9 gene is associated with polygenic hypercholesterolemia in men but not in women. *BMC Med Genet*. 2006;7:66.
162. Abboud S, Karhunen PJ, Lutjohann D, et al. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Gene Is a Risk Factor of Large-Vessel Atherosclerosis Stroke. *PLoS ONE*. 2007;2(10):e1043.
163. Leigh SE, Leren TP, Humphries SE. Commentary PCSK9 variants: A new database. *Atherosclerosis*. 2009 Mar;203(1):32-3.
164. Chan DC, Lambert G, Barrett PH, Rye KA, Ooi EM, Watts GF. Plasma proprotein convertase subtilisin/kexin type 9: a marker of LDL apolipoprotein B-100 catabolism? *Clin Chem*. 2009 Nov;55(11):2049-52.
165. Mayne J, Raymond A, Chaplin A, et al. Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Sep 21;361(2):451-6.

166. Alborn WE, Cao G, Careskey HE, et al. Serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is correlated directly with serum LDL cholesterol. *Clin Chem*. 2007 Oct;53(10):1814-9.
167. 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*. 2008 Jun;54(6):1038-45.
168. Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Jul;94(7):2537-43.
169. 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*. 2009 Sep;55(9):1637-45.
170. Dubuc G, Tremblay M, Pare G, et al. A new method for measurement of total plasma PCSK9: clinical applications. *J Lipid Res*. 2010 Jan;51(1):140-9.
171. Dubuc G, Tremblay M, Pare G, et al. A new method for measurement of total plasma PSCK9 - clinical applications. *J Lipid Res*. 2009 Jul 1.
172. 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*. 2006 May;47(5):1037-44.
173. Luo Y, Warren L, Xia D, et al. Function and distribution of circulating human PCSK9 expressed extrahepatically in transgenic mice. *J Lipid Res*. 2009 Aug;50(8):1581-8.
174. Folsom AR, Peacock JM, Boerwinkle E. Sequence variation in proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease gene, low LDL cholesterol, and cancer incidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Nov;16(11):2455-8.
175. Steinberg D, Witztum JL. Inhibition of PCSK9: a powerful weapon for achieving ideal LDL cholesterol levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 16;106(24):9546-7.

176. 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.* 2006 Aug;98(3):838-50.
177. Mbikay M, Sirois F, Mayne J, et al. PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities. *FEBS Lett.* 2010 Feb 19;584(4):701-6.
178. Ishikawa M, Iwasaki Y, Yatah S, et al. Cholesterol accumulation and diabetes in pancreatic beta-cell-specific SREBP-2 transgenic mice: a new model for lipotoxicity. *J Lipid Res.* 2008 Dec;49(12):2524-34.
179. Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, et al. Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med.* 2007 Mar;13(3):340-7.
180. Thomson BJ, Finch RG. Hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect.* 2005 Feb;11(2):86-94.
181. Labonte P, Begley S, Guevin C, et al. PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology.* 2009 Jul;50(1):17-24.
182. Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol.* 2002 Jul;76(14):6919-28.
183. Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeechockchai W, Toms GL. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol.* 2006 Mar;80(5):2418-28.
184. Gopal K, Johnson TC, Gopal S, et al. Correlation between beta-lipoprotein levels and outcome of hepatitis C treatment. *Hepatology.* 2006 Aug;44(2):335-40.
185. Mounier C, Posner BI. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006 Jul;84(7):713-24.