

**Figure 2.** Des souris infectées par *T.b. rhodesiense* ont été traitées au jour 3 par injection intrapéritonéale (flèche) de NbAn33-Tr-APOL1 (courbe bleue) ou de NbCEA5-Tr-APOL1 (courbe rouge). Le ciblage spécifique de l'APOL1 tronquée via le nanocorps élimine les parasites, et les souris survivent au moins jusqu'à la fin de l'expérience, tandis qu'à la dose utilisée l'APOL1 non ciblée ne bloque pas l'infection.

séquence des nanocorps est très semblable à celle de domaines variables d'immunoglobulines humaines. Si nécessaire, cette séquence pourrait d'ailleurs être « humanisée » davantage [10]. D'autres développements sont possibles, car la substitution de NbAn33 par NbES31, un nanocorps dirigé contre la sous-unité ESAG6 du récepteur trypanosomal de la transferrine, s'est révélée aussi efficace pour éliminer les trypanosomes chez des souris infectées. Enfin, il n'y a aucune raison que la stratégie de ciblage grâce à des nanocorps ne puisse être appliquée à d'autres agents infectieux, en fonction de la disponibilité de nanocorps spécifiques et de molécules naturelles de défense de l'hôte. ♦

## Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor

### RÉFÉRENCES

1. Pays E, Vanhamme L, Perez-Morga D. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. *Curr Opin Microbiol* 2004 ; 7 : 369-74.
2. Legros D, Ollivier G, Gastellu-Etcheberry M, et al. Treatment of human African trypanosomiasis : present situation and needs for research and development. *Lancet Infect Dis* 2002 ; 2 : 437-40.
3. Xong HV, Vanhamme L, Chamekh M, et al. A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. *Cell* 1998 ; 95 : 839-46.
4. Vanhamme L, Paturiaux-Hanocq F, Poelvoorde P, et al. Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* 2003 ; 422 : 83-7.
5. Pays E, Vanhollebeke B, Vanhamme L, et al. The trypanolytic factor of human serum. *Nat Rev Microbiol* 2006 ; 4 : 477-86.
6. Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol* 2001 ; 74 : 277-302.
7. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 1993 ; 363 : 446-8.
8. Stijlemans B, Conrath K, Cortez-Retamozo V, et al. Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 1256-61.
9. Baral TN, Magez S, Stijlemans B, et al. Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nat Med* 2006 ; 12 : 580-4.
10. Conrath K, Vincke C, Stijlemans B, et al. Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH. *J Mol Biol* 2005 ; 350 : 112-25.

## NOUVELLE

### PCSK9, du gène à la protéine Un nouvel acteur dans l'homéostasie du cholestérol

Marianne Abifadel, Jean-Pierre Rabès,  
Catherine Boileau, Mathilde Varret

> L'hypercholestérolémie familiale, à transmission autosomique dominante (ADH), est l'une des maladies génétiques les plus fréquentes (1/500 sous sa forme hétérozygote). L'excès de cholestérol lié aux lipoprotéines de basse densité (LDL, *low density lipoproteins*) provoque des dépôts artériels à l'origine de plaques d'athérome, sources de complications

cardiovasculaires graves. L'ADH est due à des mutations des gènes codant le récepteur des LDL (*LDLR*) ou son ligand l'apolipoprotéine B-100 (*APOB*). Nous avons identifié le troisième gène impliqué dans l'ADH, *PCSK9*, localisé

M. Abifadel : Inserm U781, Paris, France ;  
AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades,  
149, rue de Sèvres, 75743 Paris, France ;  
Université Paris 5, Faculté de médecine, Paris, France ;  
Université Saint-Joseph, Faculté de Pharmacie,  
BP11, 5076 Beyrouth, Liban.  
J.P. Rabès, C. Boileau : Inserm U781, 75743 Paris, France ;  
Université Paris 5, 75005 Paris, France ;  
AP-HP, Hôpital Ambroise Paré, Laboratoire de Biochimie  
et de Génétique Moléculaire ;  
Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines,  
UFR Médicale Paris Ile-de-France Ouest,  
92104 Boulogne, France.  
M. Varret : Inserm U781, 75743 Paris, France ;  
Université Paris 5, 75005 Paris, France.  
[abifadel@necker.fr](mailto:abifadel@necker.fr)



en 1p32. Cela a été réalisé par approche de clonage positionnel et d'analyse de liaison dans des familles françaises dont l'hypercholestérolémie n'était liée à aucun des gènes *LDLR* ou *APOB* [1]. Le gène *PCSK9* (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) code une enzyme initialement nommée Narc-1 (*neural apoptosis regulated convertase 1*) puisque son ADNc fut cloné suite à sa surexpression dans des neurones en apoptose induite par une privation en sérum. Principalement exprimée dans le foie, l'iléon, le côlon, le rein et le système nerveux, Narc-1 est le 9<sup>e</sup> membre de la famille des proprotéines convertases, enzymes impliquées dans la protéolyse ciblée de précurseurs protéiques, tels que les prohormones au cours de leur processus sécrétoire. Synthétisée sous forme de préproprotéine de 692 acides aminés, préproNarc-1 perd son peptide signal pour donner un zymogène de 72 kDa (proNarc-1) qui subit un autoclivage dans le réticulum endoplasmique [2]. Ses substrats ainsi que son rôle exact sont encore inconnus, cependant les variations de *PCSK9* sont associées tant à l'hypercholestérolémie qu'à l'hypocholestérolémie.

### Mutations

#### hypercholestérolémiantes de *PCSK9*

Nous avons identifié les deux premières mutations hypercholestérolémiantes de *PCSK9* dans trois familles françaises recrutées grâce au Réseau national de recherche sur les hypercholestérolémies familiales qui regroupe treize centres sur le territoire français<sup>1</sup>. La mutation p.S127R a été trouvée dans deux grandes familles, l'une originaire de Vendée et l'autre de Mayenne. La mutation p.F216L a été identifiée dans une famille française dont le proposant, décédé à l'âge de 49 ans d'un infarctus du myocarde, avait des

taux de LDL-cholestérol au-delà de 3,5 g/l sans traitement [1]. Par la suite, nous avons rapporté les variations p.R218S et p.R357H dans deux familles françaises [3]. Parallèlement, quelques mutations hypercholestérolémiantes ont été trouvées par différentes équipes. La mutation p.D374Y a été décrite dans une famille de l'Utah [4], deux familles norvégiennes [5] et quatre familles anglaises [6]. Enfin, les variations p.R469W, p.R496W, p.N425S ont été retrouvées, associées à des mutations du gène *LDLR*, chez des patients présentant une hypercholestérolémie particulièrement sévère [3, 7] (Figure 1).

### Variations

#### hypocholestérolémiantes de *PCSK9*

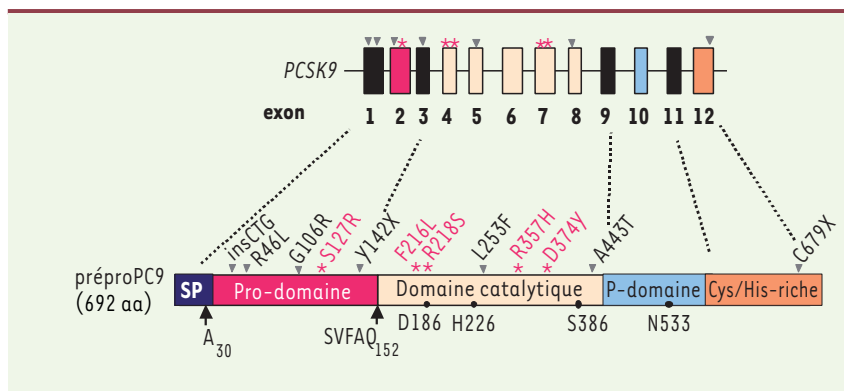
Parallèlement, des variations hypocholestérolémiantes de *PCSK9* ont été rapportées. Les variations non-sens p.Y142X et p.C679X, fréquentes chez les Afro-américains (fréquence combinée de 2%), sont associées à un faible taux de LDL-cholestérol [8, 9]. D'autres variations p.R46L, p.L253F p.A443T [9], p.G106R [10] et c.43-44insCTG [11] sont retrouvées associées à des réductions des taux de LDL-cholestérol allant de 3,5% à 30% dans des études indépendantes (Figure 1). Par ailleurs, les variations IVS1-161C→T et p.I474V sont associés à des taux bas de LDL-cholestérol dans une population japonaise [12]. L'étude de l'impact de trois de ces varia-

tions hypocholestérolémiantes sur l'incidence des maladies cardiovasculaires survenues sur une période de 15 ans a été réalisée dans une cohorte de 3363 sujets afro-américains et 9523 caucasiens âgés de 45 à 64 ans, issus de 4 communautés américaines [13]. Les variations non-sens retrouvées avec une fréquence de 2,6% chez les sujets afro-américains sont associées à une réduction des taux de LDL-cholestérol de 28% ainsi qu'à une réduction des maladies cardiovasculaires de 88% dans cette population, alors que la variation p.R46L retrouvée chez 3,2% des sujets caucasiens est associée à une réduction des taux de LDL-cholestérol de 15% et à une réduction des maladies cardiovasculaires de 47% [13]. Cette étude conforte le rôle cardioprotecteur d'une réduction à long terme des taux de cholestérol, mais n'exclut pas un rôle protecteur direct de Narc-1.

### *PCSK9* et homéostasie

#### du cholestérol : un rôle à décrypter

Le rôle exact de *PCSK9* dans l'homéostasie du cholestérol n'est pas encore élucidé. L'effet principalement étudié de *PCSK9* est de réguler la variation du taux de récepteurs des LDL à la surface cellulaire. Les mutations hypercholestérolémiantes entraînent une diminution de 23% des récepteurs des LDL à la surface des cellules HepG2 transfectées par *PCSK9* muté et une diminution de 38% de l'internalisa-



**Figure 1. *PCSK9*, du gène à la protéine : variations hypo- et hypercholestérolémiantes et domaines protéiques.** Les mutations hypercholestérolémiantes sont représentées en rose, les variations hypocholestérolémiantes en noir. Sont aussi représentés les sites de clivage potentiels, la triade catalytique et le site de glycosylation N533.

<sup>1</sup> Réseau National de Recherche sur les hypercholestérolémies familiales : Dr Isabel Beucler, Pr Eric Brucker, Dr Bernard Chanu, Dr Henry Dabadie, Dr Martine Devillers, Dr Danièle Erlich, Dr Michel Farnier, Pr Jean Ferrières, Pr. Alexandre Fredenrich, Pr. Jean-Philippe Girardet, Dr Athina Kalopisis, Pr Michel Krempf, Pr Jean-Michel Lecerf, Pr Gérald Luc, Dr Maria Martinez, Pr Philippe Moulin, Dr Laurence Perrot, Pr Michel Polak, Pr Jean-Louis Shlinger.

tion des LDL. Inversement, les mutations hypocholestérolémiantes provoquent une augmentation des récepteurs des LDL en surface cellulaire de 16 % et une augmentation de l'internalisation des LDL de 35 % [14]. Cette action de Narc-1 sur le récepteur des LDL est confirmée dans des modèles murins surexprimant, par infection adénovirale, *PCSK9* normal ou porteur des mutations p.S127R et p.F216L. Ainsi, une augmentation (x2 à x5) des taux de cholestérol et de LDL-cholestérol, et une forte diminution des taux de récepteurs hépatiques des LDL sont observées chez les souris [15]. Les souris *PCSK9*<sup>-/-</sup> sont hypocholestérolémiques, avec des taux de cholestérol plasmatique 48 % inférieurs à ceux de souris témoins. Elles présentent une augmentation du nombre de récepteurs des LDL, une augmentation de la capture des LDL et une réponse plus importante au traitement par les statines [16]. L'hypothèse issue de ces travaux positionne *PCSK9* dans un processus de dégradation du récepteur des LDL au niveau du compartiment post-réticulum endoplasmique [15]. Enfin, *PCSK9*, sécrétée dans le plasma, semble capable d'agir à distance dans ce même processus [14].

Parallèlement à son impact sur le récepteur des LDL, *PCSK9* agit en augmentant la biosynthèse hépatique des lipoprotéines riches en apo B-100, comme le prouvent les études cinétiques *in vivo* réalisées chez deux sujets porteurs de la mutations S127R [17]. Par ailleurs, l'expression de *PCSK9* est régulée par les facteurs de transcription SREBP grâce à un domaine de réponse aux stéroïdes (SRE) dans son promoteur [15].

### PCSK9, statines et nouveaux espoirs thérapeutiques

Les statines, principale classe d'hypocholestérolémiantes, sont des inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, enzyme clé de la synthèse du cholestérol. La diminution du cholestérol intracellulaire entraîne une activation de la voie des SREBP et donc l'augmentation de l'expression de différents gènes cibles, notamment du gène *LDLR*. *PCSK9* étant aussi une cible des

SREBP, son expression est induite par les statines [18] et limiterait donc leur action en diminuant le nombre des récepteurs des LDL à la surface cellulaire. Cela est confirmé, chez les souris *PCSK9*<sup>-/-</sup>, qui présentent une réponse plus importante au traitement par les statines [16]. En outre, certaines variations hypocholestérolémiantes de *PCSK9* (p.R46L, p.N157K) seraient associées à une meilleure réponse aux statines [10]. Ces arguments soulignent l'importance thérapeutique des inhibiteurs de cette enzyme qui restent cependant à identifier.

La découverte de *PCSK9*, troisième gène impliqué dans l'hypercholestérolémie à transmission autosomique dominante, a permis jusqu'à présent de lever le voile sur un nouvel acteur majeur impliqué dans la maladie et dans l'homéostasie du cholestérol. Elle met aussi en évidence des variations géniques responsables d'une importante variabilité inter-individuelle et inter-ethnique des taux de cholestérol. Cependant, il semble que *PCSK9* ait encore beaucoup de secrets à livrer. L'identification de ses substrats permettra d'élucider le rôle exact de ce nouveau protagoniste dans le métabolisme et la régulation du cholestérol. D'éventuels inhibiteurs de Narc-1 pourraient potentialiser l'action hypocholestérolémiantes des statines et constituer une nouvelle classe de molécules hypocholestérolémiantes. ♦

### PCSK9, from gene to protein: a new actor involved in cholesterol homeostasis

#### REMERCIEMENTS

Les travaux de MAF ont été financés par la Fondation Lefoulon-Delalande, Institut de France. Ce projet est soutenu par l'attribution d'une allocation post-doctorale Région Ile-de-France, par un financement du GIS-Institut des Maladies Rares, de l'Université Paris 5, de l'ANR « Cardiovasculaire, obésité et diabète 2005 » et du Programme CEDRE.

#### RÉFÉRENCES

1. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, et al. Mutations in *PCSK9* cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003; 34 : 154-6.

2. 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 USA* 2003; 100 : 928-33.
3. Allard D, Amselem S, Abifadel M, et al. Novel mutations of the *PCSK9* gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 2005; 26 : 497.
4. Timms KM, Wagner S, Samuels ME, et al. A mutation in *PCSK9* causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet* 2004; 114 : 349-53.
5. Leren TP. Mutations in the *PCSK9* gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet* 2004; 65 : 419-22.
6. Naumova 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; 25 : 2654-60.
7. Pisciotta L, Oliva CP, Cefalù AB, et al. Additive effect of mutations in *LDLR* and *PCSK9* genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2006; 186 : 433-40.
8. Cohen J, Pertsemliadis A, Kotowski IK, et al. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in *PCSK9*. *Nat Genet* 2005; 37 : 161-5.
9. Kotowski IK, Pertsemliadis A, Luke A, et al. A spectrum of *PCSK9* alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Hum Genet* 2006; 78 : 410-22.
10. 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.
11. Yue P, Averna M, Lin X, Schonfeld G. The c.43-44insCTG variation in *PCSK9* is associated with low plasma LDL-cholesterol in a Caucasian population. *Hum Mutat* 2006; 27 : 460-6.
12. Shioji K, Mannami T, Kokubo Y, et al. Genetic variants in *PCSK9* affect the cholesterol level in Japanese. *J Hum Genet* 2004; 49 : 109-14.
13. 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.
14. Cameron J, Holla OL, Ranheim T, et al. Effect of mutations in the *PCSK9* gene on the cell surface LDL receptors. *Hum Mol Genet* 2006; 15 : 1551-8.
15. Maxwell KN, Breslow JL. Proprotein convertase subtilisin kexin 9 : the third locus implicated in autosomal dominant hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16 : 167-72.
16. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking *Pcsk9*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 : 5374-9.
17. Ouguerram K, Chetiveaux M, Zair Y, et al. Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in *PCSK9*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24 : 1448-53.
18. 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; 24 : 1454-9.