HAL
open science

Le rôle du récepteur aux LDL et de PCSK9 dans le diabète de type 2

Stéphane Ramin-Mangata

To cite this version:

Stéphane Ramin-Mangata. Le rôle du récepteur aux LDL et de PCSK9 dans le diabète de type 2. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de la Réunion, 2020. Français. NNT : 2020LARE0005 . tel-02927160

HAL Id: tel-02927160

https://theses.hal.science/tel-02927160v1

Submitted on 1 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de La Réunion

Ecole doctorale
Science, Technologies et Santé

Discipline
Biologie Santé, Biochimie

Unité de Recherche
INSERM UMR1188 Diabète athérothrombose thérapies Réunion Océan Indien

Le rôle du récepteur aux LDL et de PCSK9 dans le diabète de type 2

Présentée et soutenue publiquement le ***mercredi 17 juin 2020*** *par*

Stéphane RAMIN-MANGATA

Jury

Marie-Paule GONTHIER, *Pr, Université de La Réunion, UMR1188*	***Présidente***
Mathilde VARRET, *CR (HDR), INSERM U1148 LVTS*	***Rapporteur***
Laurent MARTINEZ, *DR2, INSERM U1048 I2MC*	***Rapporteur***
Mikaël CROYAL, *IGR, CRNH Nantes*	***Examinateur***
Aurélie THEDREZ, *IGR, INSERM UMR1087/CNRS UMR6291*	***Encadrante***
Gilles LAMBERT, *Pr, Université de La Réunion, UMR1188*	***Directeur de thèse***

In sèl piédboi i fé pa in foré,

Sak shoz nana son lan,

Forstan, gro moilon i fini ti pilon…

L'union fait la force,

Chaque chose en son temps,

On vient à bout de tout avec du travail et de la persévérance…

A mes parents,

UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION

POLE RECHERCHE
Ecoles **D**octorales

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) Mr. Stéphane RAMIN-MANGATA en ma qualité de doctorant de l'Université de La Réunion, déclare être conscient que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint Paul le 18 mai 2020

Signature :

Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de tels droits.
En conséquence, chaque utilisateur doit :
- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux
Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.
L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».
L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (…) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.
Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage…) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur…) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.
Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.

Résumé

Les statines sont des médicaments hypolipémiants largement prescrits dans le cadre des maladies cardiovasculaires. Elles inhibent la synthèse endogène de cholestérol et induisent l'activation de l'expression du LDLR par le facteur de transcription SREBP-2. Ce sont des médicaments dont le bénéfice est indiscutable d'un point de vue cardiovasculaire. Néanmoins, l'action des statines est limitée par la proprotéine convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9), l'inhibiteur naturel du récepteur aux LDL (LDLR), qui est également sous la dépendance de SREBP-2. Ainsi, de nouvelles stratégies hypolipémiantes ciblant la forme circulante de PCSK9 ont été développées et autorisées. Ce sont les inhibiteurs de PCSK9.

Bien que bénéfique, l'utilisation de statines à forte dose et à long terme induit dans certains cas l'apparition d'un diabète de type 2 chez les individus prédisposés. De plus, des variants génétiques « perte de fonction » de PCSK9 sont associés à l'apparition du diabète de type 2. Les effets des inhibiteurs de PCSK9 sur la survenue du diabète de type 2 à long terme ne sont pas connus à ce jour.

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'engorgement en cholestérol des cellules β pancréatiques associé à des niveaux très élevés d'abondance du LDLR à la membrane suite à l'utilisation des statines et d'inhibiteurs de PCSK9 induit un dysfonctionnement cellulaire, une altération de la sécrétion d'insuline et à terme le diabète de type 2. Les objectifs de mes travaux de thèse ont été (i) de déterminer la modulation des taux de PCSK9 par les statines chez des individus diabétiques de type 2, (ii) d'étudier si les niveaux circulants réduits en PCSK9 seraient prédictifs de la survenue du diabète de type 2 et enfin (iii) d'évaluer l'effet des statines, de PCSK9 et des inhibiteurs de PCSK9 sur la sécrétion d'insuline par les cellules β.

Au moyen de trois cohortes de patients, nous avons montré que la concentration plasmatique de PCSK9 est augmentée chez les diabétiques de types 2 et que les niveaux de PCSK9 circulants réduits sont négativement associés à une résistance à l'insuline et à une altération de la glycémie à jeun. En utilisant des sections de pancréas humains et des lignées de cellules β pancréatiques humaines, nous avons démontré pour la première fois que PCSK9 est exprimé, synthétisé et sécrété uniquement par les cellules β pancréatiques au niveau des îlots de Langerhans. Nous n'avons pas observé d'effet de PCSK9 et de ses inhibiteurs sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. L'ensemble des résultats de mes travaux de thèse indiquent que l'inhibition de PCSK9 n'aura vraisemblablement pas d'effet pro-diabétogène, ce qui est rassurant pour le développement de ces nouvelles thérapies hypocholestérolémiants.

Abstract

Statins are lipid-lowering drugs widely prescribed to prevent cardiovascular diseases. They inhibit the endogenous synthesis of cholesterol and thereby increase LDLR gene expression by activating the SREPB-2 transcription factor. The positive effects of statins regarding cardiovascular diseases are undisputable. However, their action is limited by the proprotein convertases subtilisin kexin type 9 (PCSK9), the natural inhibitor of the LDL receptor (LDLR), which is also activated by the SREBP-2 transcription factor. As a result, novel lipid-lowering strategies targeting circulating PCSK9 have emerged and have been approved recently. These are the PCSK9 inhibitors.

Despite their well-established beneficial effects, the use of high doses of statins for long-term treatments induces in rare instances the onset of type 2 diabetes in predisposed individuals. In addition, “loss of function” genetic variants of PCSK9 are associated with an increased risk of type 2 diabetes. The effects of long term use of PCSK9 inhibitors on the risk of type 2 diabetes remain to be established.

Thus, we hypothesized that cholesterol overload of insulin secreting pancreatic β-cells induced by the overexpression of the LDLR at their plasma membranes following treatment with statins and PCSK9 inhibitors may cause cell dysfunction, lower insulin secretion, and ultimately type 2 diabetes. The aims of my thesis were (i) to determine the circulating levels of PCSK9 and their modulation by statins in patients with type 2 diabetes, (ii) to determine if reduced circulating PCSK9 levels are predictive of new onset type 2 diabetes and finally (iii) to investigate the effect of statins, PCSK9, and PCSK9 inhibitors on β cell function.

Using three cohorts of patients, we showed that circulating PCSK9 plasma levels are increased in patients with type 2 diabetes and that reduced circulating PCSK9 levels are negatively associated with insulin resistance and elevated fasting blood glucose. In human pancreatic sections and human pancreatic β cell lines, we showed for the first time that PCSK9 is expressed, synthesized and secreted only by β cells in pancreatic islets. We did not find any significant effect of PCSK9 or PCSK9 inhibitors on glucose stimulated insulin secretion. Altogether, my thesis works underpin that the use of PCSK9 inhibitors in the clinic will probably not be diabetogenic. This is reassuring regarding the development of these new lipid-lowering therapies.

Remerciements

La thèse est une formation à la recherche par la recherche. Il s'agit d'un travail personnel que l'on accomplit, en réalité, avec l'aide d'un directeur de thèse, d'une équipe, des amis, de la famille et d'autres personnes. C'est pourquoi je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué à ma thèse de près ou de loin.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse malgré leur emploi du temps chargé. Je remercie le Pr. Marie-Paule GONTHIER, présidente du jury, le Dr. Mathilde VARRET et le Dr. Laurent MARTINEZ, rapporteurs de ma thèse et le Dr. Mikaël CROYAL examinateur.

J'exprime ma profonde gratitude envers le Pr. Gilles LAMBERT, directeur de thèse, qui m'a offert l'opportunité de préparer cette thèse. Je vous remercie pour votre temps et votre disponibilité, vos conseils et votre encadrement. Je vous remercie également pour l'ensemble des présentations corrigées, les relectures de manuscrits, la relecture et correction de ma thèse. Merci de m'avoir permis de présenter mes travaux lors de congrès internationaux ! J'ai beaucoup appris à vos côtés ! Enfin, je vous remercie pour votre confiance et de vous être autant investi dans ma thèse !

Un grand merci au Dr. Aurélie THEDREZ, encadrante de ma thèse, pour m'avoir appris à cultiver les lignées de cellules β pancréatiques. Grâce à toi j'ai appris et gagné grandement en autonomie. Je te remercie également pour la rigueur scientifique que tu auras su m'apporter. Merci pour la relecture de l'intégralité de ma thèse et pour tes corrections. Je te remercie aussi pour ton temps et tes conseils.

Je tiens à remercier le Dr. Olivier MEILHAC, directeur de l'unité DéTROI, de m'avoir accepté dans l'équipe. Merci pour tes conseils et discussions scientifiques ! « On envoie du steak! ». Je profite de l'occasion pour remercier l'intégralité de l'équipe DéTROI. Merci pour l'ensemble des discussions scientifiques, de m'avoir pris dans l'équipe dès mon premier jour ! Je pense particulièrement à Nicolas, Steeve, Matthieu, Pierre, Philippe, Cynthia, Jean-Loup, Manu.

Une partie de ma thèse a été réalisée à Nantes dans l'équipe du Pr. CARIOU. Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de L'Institut du Thorax. Merci également pour cette belle collaboration sur la cohorte IT-DIAB. Je remercie également Stéphanie et Audrey de la plateforme de spectrométrie de masse pour leur aide précieuse !

Je remercie le Pr. Raul Santos qui m'a permis, au travers d'une collaboration avec la cohorte ELSA-Brasil, de mener à bien un de mes objectifs de thèse.

Un grand merci à mes collègues devenus amis de la « Dream Team », Brice, Valentin, Ilya, Kevin, Clément et Mathias ! Cette thèse a été possible aussi grâce à vous ! Merci pour tous nos

moments studieux mais aussi de rigolade. Je vous souhaite le meilleur pour la suite ! Ce fut un honneur de travailler avec vous les « ti pi... » !

Je tiens également à remercier l'ensemble des doctorantes et doctorants pour nos discussions et moments de travail ou de détente. Je tiens particulièrement à remercier Bryan, mon ami, aussi bien pour toutes nos discussions scientifiques que pour les farces que l'on a pu faire ! Merci à Chloé, Jonathan Turpin, Sandra, Axel, Jason, Eva, Angélique Gajahi, Anthony, Sébastien Tanaka, Axia, Anne-Claire, Jennifer BV, Laura G. Je n'oublie pas les autres étudiants de master avec qui nous avons partagé de bons moments. Merci à Mr Bègue, Téva, Julien, Ludo, Jade, Aurélien. Pour ceux que j'aurais pu oublier, je m'en excuse par avance. Je remercie également les membres du CYROI et en particulier Giovédie, Seb, Imade, Michel et la team des vieilles pies.

Un grand merci à Wildriss et Céline ! Merci pour votre aide ! Wildriss merci pour tout ce que tu m'as appris en science. Je te remercie pour toutes les techniques que tu m'as apprises et pour tous les réactifs dépannés.

Merci au Dr. Marc GENSSE, agrégé de biochimie, vous qui me suivez depuis mes débuts en BTS ! Merci de m'avoir transmis cette passion pour la biochimie ! Merci pour vos conseils !

Je tiens à remercier l'ensemble des mes amis que je n'ai pas eu l'occasion de remercier dans ces quelques lignes. Je pense particulièrement à Jimmy et à Bagavathy. Merci également à ma team de JJB et de MMA ! Merci Oliv, Francis, Fabrice, de m'avoir accepté sur le tatami tout en étant en retard. Merci à Yannick, Flo, Véro, Nico, Dan, Didier, Antoine, Alain, Yousr, Guillaume vous qui avez suivi ma thèse de près ou de loin. Merci également à tous les autres de l'équipe grâce à vous j'ai pu m'aérer les pensées pendant ma thèse.

Mes deux amies Stéphanie et Nadjlah, ces 2 lignes sont pour vous ! Je vous remercie également pour vos encouragements tout au long de cette aventure qu'est la thèse.

Un grand merci aux parents de ma copine, Yvette et Arsène, pour leur soutien et les innombrables discussions de qualité que l'on a pu avoir. Je vous remercie chaleureusement pour vos conseils et pour tout le reste !

Eloïse, ma moitié, je te remercie pour le soutien que tu as su m'apporter durant cette thèse et dans la vie de tous les jours. Je te remercie pour tes conseils, tes encouragements, ta présence, ta compréhension et toutes tes qualités ! Merci pour tout ! Tu es une personne d'exception !

Je terminerai par remercier ma famille, mes frères (David, Michel, Frédéric, Philippe, Christophe) et mes parents Carmen et Simon. Maman, Papa, mes frères, c'est en très grande partie grâce à vous si je suis arrivé à ce niveau aujourd'hui ! Merci pour tout ! Je vous en serai éternellement reconnaissant !

Liste des abréviations

ABCA1	ATP binding cassette A1
ACAT	Acyl-CoA cholestérol acyl transférase
ADA	American diabetes association
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	AMP activated protein kinase
AP2	Adaptor protein 2
Apo	Apolipoprotéine
ARH	Autosomal recessive hypercholesterolemia
ARIC	Atherosclerosis risk in communities
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ASO	Antisens oligonucleotide
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
CAP1	Cyclase associated protein 1
CD36	Cluster de différenciation 36
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
CML	Cellule musculaire lisse
COPII	Coat protein complex II
DESCARTES	Durable effect of PCSK9 antibody compared with placebo study
DPP-4	Dipeptidyl peptidase 4
EASD	European society for the study of diabetes
EGF-A	Epidermal growth factor A
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Epac2	Exchange protein directly activated by cAMP 2
ESC	European society of cardiology
FADH2	Flavine adénine dinucléotide
FDA	Food and drug administration
FH	Familial Hypercholesterolemia
GIP	Gastric inhibitory polypeptide
GLP-1	Glucagon like peptide 1
GLUT	Glucose transporter
GOF	Gain of function
GSIS	Glucose stimulated insulin secretion
GWAS	Genome wide association study

HbA1c	Hémoglobine glyquée A1c
HDL	High Density Lipoprotein
HDL-C	HDL cholestérol
HeFH	Heterozygous familial hypercholesterolemia
HL	Hepatic lipase
HMG-CoA	Hydroxy méthyl glutaryl coenzyme A
HMGCR	Hydroxy méthyl glutaryl coenzyme A réductase
HNF1a	Hepatocyte nuclear factor 1a
HoFH	Homozygous familial hypercholesterolemia
HOMA-IR	Homeostasis model assessment for insulin resistance
HSPG	Heparane sulfate proteoglycan
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IDOL	Inducible degrader of LDLR
IMC	Indice de masse corporelle
IMPROVE-IT	Improve Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial
Insig-1	Insulin induced gene 1
INSR	Insulin receptor
IRS	Insulin receptor substrate
JUPITER	Justification for the use of statins in prevention: an intervention trial evaluating rosuvastatin
KO	Knock out
LCAT	Lécithine cholestérol acyl transférase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-C	LDL cholestérol
LDLox	LDL oxydées
LDLR	LDL receptor
LDLRAP1	LDLR adaptor protein 1
LKB1	Liver kinase B1
LNP	Lipoïd nano particle
LOF	Loss of function
Lp(a)	Lipoprotéine (a)
LPL	Lipoprotéine lipase
MEDPED	Make early diagnosis to prevent early deaths
MEFs	Mouse embryonic fibroblasts
MI	Myocardial infarction
MTTP	Microsomal triglyceride transfer protein
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide

NARC-1	Neural apoptosis regulated convertase 1
NPC1L-1	Niemann-Pick C1-Like 1
OGTT	Oral glucose totelance test
OMS	Organisation mondiale de la santé
OR	Odds ratio
OSLER	Open label study of long term evaluation against LDL-C trial
PCSK1	Proprotéine convertase subtilisine kexine de type 1
PCSK2	Proprotéine convertase subtilisine kexine de type 2
PCSK9	Proprotéine convertase subtilisine kexine de type 9
PDGF	platelet derived growth factor
PDX-1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
PI3K	Phosphatidyl inositol 3 kinase
PKA	Protéine kinase A
PROFICIO	Program to reduce LDL-C and cardiovascular outcomes following inhibition of PCSK9 in different population
RE	Réticulum endoplasmique
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
S1P	Site 1 protease
S2P	Site 2 protease
SCAP	SREBP cleavage activating protein
SCORE	Systematic coronary risk estimation
SGLT-2	Sodium glucose cotransporter 2
SIK	Salt inducible kinase
siRNA	small interferant ribonucleic acid
SPARCL	The stroke prevention by aggressive reduction in cholesterol levels
SPIRE	Study of PCSK9 inhibition and the reduction of vascular events
SRA	Scavenger receptor A
SR-BI	Scavenger receptor class B type 1
SRE	Sterol regulatory element
SREBP-2	Sterol regulatory element binding protein 2
SREBPs	Sterol regulatory element binding proteins
SUR1	Sulfonylurea receptor 1
TG	Triglycéride
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VTE	Venous thromboembolism
WT	Wild type

Table des matières

Introduction Générale 2
Etude Bibliographique 6
I. Les lipoprotéines et l'athérosclérose 7
1. Les lipoprotéines 7
2. Les maladies cardiovasculaires et l'athérosclérose 16
3. L'hypercholestérolémie familiale et le récepteur aux LDL 21
4. Les hypolipémiants 27
II. Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9 36
1. La découverte de PCSK9 36
2. La génétique de PCSK9 38
3. Expression et mode d'action de PCSK9 43
4. Les inhibiteurs de PCSK9 56
5. Les effets secondaires des inhibiteurs de PCSK9 69
III. Le diabète de type 2 76
1. Définition et étiologie 76
2. Physiopathologie du diabète de type 2 79
3. La cellule bêta 82
4. Les traitements du diabète de type 2 88
5. Les hypolipémiants et la physiologie des cellules bêta 94
Objectifs de la thèse 103
Travaux personnels 107
1. Valorisation des recherches bibliographiques 108
2. Premier article 115
3. Deuxième article 126
4. Troisième article 142
Discussion et perspectives 188
Annexes 198
Références bibliographiques 204

Liste des figures

Figure 1 : Expression de PCSK9 dans les cellules β pancréatiques sur section de pancréas humains

Figure 2 : Représentation d'une particule de lipoprotéine

Figure 3 : Synthèse des chylomicrons après une prise alimentaire

Figure 4 : La voie endogène du cholestérol

Figure 5 : Le transport inverse du cholestérol

Figure 6 : Schéma de la structure d'une artère saine

Figure 7 : Progression schématique du processus athéromateux

Figure 8 : Relation entre la liaison et la dégradation du LDL marquée à l'iode 125 chez des fibroblastes provenant d'individus atteints d'hypercholestérolémie familiale

Figure 9 : Classes fonctionnelles des mutations sur le récepteur aux LDL

Figure 10 : Le cholestérol ajouté induit une diminution de l'abondance du LDLR et de l'HMGCR

Figure 11 : La compactine induit une diminution du taux de cholestérol plasmatique

Figure 12 : Effets de la diminution du LDL-C sur l'incidence des maladies cardiovasculaires

Figure 13 : Activation de SREBP-2 après déplétion en cholestérol

Figure 14 : Mode d'action de l'ézétimibe

Figure 15 : Efficacité de la supplémentation du traitement statine avec ézétimibe sur les évènements cardiovasculaires

Figure 16 : Analyse génétique et détection des mutations dans une des deux familles françaises hypercholestérolémiques

Figure 17 : La surexpression de PCSK9 entraine une augmentation du LDL-C de façon LDLR dépendante

Figure 18 : Distribution des taux de cholestérol plasmatiques et incidence des maladies cardiovasculaires chez les porteurs de mutations 142X ou 679X et les individus non mutés sur PCSK9

Figure 19 : Expression de l'ARNm de PCSK9 dans des tissus murins

Figure 20 : L'expression de PCSK9 par des hépatocytes HepG2 est augmentée après un traitement à l'atorvastatine

Figure 21 : Le paradoxe des statines

Figure 22 : L'endocytose de PCSK9 est dépendante du LDLR

Figure 23 : Mécanisme de dégradation du LDLR par PCSK9

Figure 24 : Effet d'Inclisiran sur PCSK9 et le LDL-C après une ou deux injections

Figure 25 : Diminution des taux de LDL cholestérol après injection d'Alirocumab

Figure 26 : Efficacité d'Alirocumab sur les points finaux de l'étude

Figure 27 : Diminution des taux de LDL cholestérol au bout de 158 semaines après injection d'Evolocumab

Figure 28 : Efficacité d'Evolocumab sur les points finaux de l'étude

Figure 29 : Diminution des taux de LDL cholestérol au bout de 14 semaines après injection de Bococizumab

Figure 30 : Effet d'Alirocumab sur l'incidence de développer un DT2

Figure 31 : Effet d'Evolocumab sur l'incidence de développer un DT2

Figure 32 : Critères de diagnostic du diabète

Figure 33 : Association de variants génétiques et incidence de développer un DT2

Figure 34 : Activation du récepteur à l'insuline et translocation de GLUT à la membrane

Figure 35 : Diminution de la sécrétion d'insuline suite à une stimulation au glucose en présence de LDL

Figure 36 : Différence structurale entre les îlots de Langerhans humains et murins

Figure 37 : Sécrétion biphasique d'insuline par la cellule β pancréatique suite à une stimulation au glucose

Figure 38 : Variation de la glycémie et de l'insulinémie des souris Pcsk9 knockout après stimulation au glucose

Figure 39 : Effets d'un traitement rosuvastatine sur les évènements cardiovasculaires majeurs et le DT2 chez des individus avec ou sans prédispositions

Figure 40 : Impact de l'accumulation de cholestérol sur la sécrétion d'insuline par des souris contrôles, ApoE knockout et ob/ob

Figure 41 : Expression du LDLR et accumulation de cholestérol dans les souris contrôles et les souris hétéro- homozygotes sur-exprimant SREBP-2

Figure 42 : Expression différentielle de PCSK9 dans les îlots de Langerhans humains isolés

Figure 43 : Le rôle de PCSK9 pancréatique

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des lipoprotéines

Tableau 2 : Prévalence de l'hypercholestérolémie familiale hétérozygote et homozygote dans différentes régions

Tableau 3 : Effet des statines sur les niveaux circulants de PCSK9

Tableau 4 : Prévalence du DT2 chez les individus HF et les membres sains de leur famille avant et après ajustement

Introduction Générale

Les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité dans le monde. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 31% de la mortalité mondiale est due aux maladies cardiovasculaires avec 17,7 millions de décès (chiffre de 2015). Souvent, ces pathologies sont la conséquence d'un dysfonctionnement du métabolisme des lipoprotéines et d'une surcharge en cholestérol associée. L'athérosclérose est la pathologie la plus représentative de ce dysfonctionnement et constitue la cause principale des infarctus du myocarde et de l'accident vasculaire cérébral. En effet, l'athérosclérose se caractérise par des lésions artérielles dues à la rétention de Low Density Lipoprotein (LDL) oxydées (LDLox) dans l'intima pouvant à terme conduire à une sténose ou une thrombose.

Le récepteur aux LDL (LDLR) est la voie métabolique majeure par laquelle les LDL qui circulent dans les artères sont épurées, principalement au niveau du foie. Des modifications de l'abondance ou de la fonction du LDLR peuvent entrainer des dyslipidémies et des maladies cardiovasculaires. Lorsque le métabolisme des lipoprotéines est dérégulé, des traitements pharmacologiques hypolipémiants peuvent être envisagés. Parmi ces médicaments hypolipémiants, les plus prescrits sont les statines.

L'efficacité des statines sur la réduction des maladies cardiovasculaires n'est plus à démontrer. Néanmoins, des effets pléiotropes des statines autres que leur implication dans la diminution du taux de LDL-cholestérol (LDL-C) ont été observés. En effet, un risque faible mais significatif de développer un diabète de type 2 (DT2) a été observé chez des individus prédisposés. L'engorgement en cholestérol des cellules β pancréatiques pourrait être à l'origine de ce risque.

En 2015, de nouvelles stratégies hypolipémiantes ont été autorisées. Il s'agit d'anticorps dirigés contre la Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9 (PCSK9), une protéine impliquée dans la régulation du LDLR et donc du taux de LDL-C. Des mutations sur le gène de PCSK9 conférant une réduction des taux de LDL-C sont cardio-protectrices mais elles sont aussi

associées à un risque significatif de développer un diabète de type 2. Les premiers essais cliniques sur les inhibiteurs de PCSK9 ne font pas état de l'apparition de ce risque. Néanmoins, les conclusions de ces études sur le risque d'apparition du diabète peuvent être nuancées par le temps trop court de suivi de ces patients. Des études plus approfondies doivent être menées sur les effets que pourraient avoir PCSK9 et les anticorps anti-PCSK9 sur la régulation de la glycémie et en particulier sur la physiologie des cellules β pancréatiques.

Les objectifs principaux de ma thèse ont été (i) de déterminer et comparer les niveaux de PCSK9 chez des patients atteints de diabète de type 2 et des individus non diabétiques et d'étudier l'effet d'un traitement par une statine sur ces niveaux ; (ii) d'évaluer si PCSK9 est un biomarqueur prédictif de la survenue du diabète de type 2 ; (iii) d'évaluer les effets de PCSK9 et de l'engorgement en cholestérol des cellules β pancréatiques sur la sécrétion d'insuline. Le résultat majeur de ma thèse a été la mise en évidence de l'expression de PCSK9 au niveau des cellules β pancréatiques humaines **(Figure 1)**.

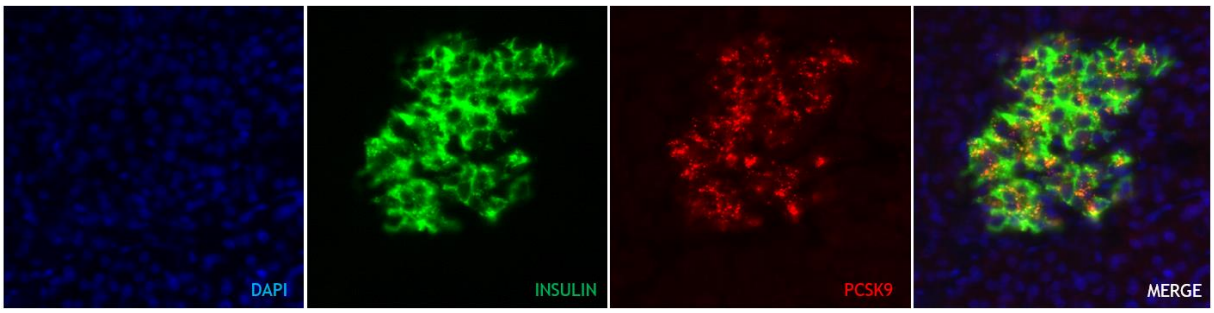


Figure 1 : Expression de PCSK9 dans les cellules β pancréatiques sur section de pancréas humains (Stéphane RAMIN-MANGATA). L'analyse de section de pancréas humain en immunofluorescence a permis de mettre en évidence l'expression de PCSK9 uniquement dans les cellules β pancréatiques humaines.

Pour une meilleure compréhension de mon sujet de thèse, mon manuscrit est organisé en plusieurs sections. La première section « ***Introduction générale*** » décrit et introduit de façon succincte mon sujet de thèse. La deuxième section « ***Etude bibliographique*** » apporte les

éléments de la littérature détaillés et importants à la compréhension des travaux réalisés au travers de 3 chapitres : (i) ***Les lipoprotéines et l'athérosclérose***, (ii) ***Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9*** et (iii) ***Le diabète de type 2***. La troisième section « ***Objectifs de la thèse*** » résume les éléments clés de la littérature et présente de façon détaillée les objectifs de ma thèse. Les travaux expérimentaux que j'ai réalisés pour répondre à ces objectifs sont présentés dans la quatrième section « ***Travaux personnels*** » sous forme de 4 publications acceptées ou en révision accompagnées d'une introduction et d'une discussion. Une discussion et une conclusion générale concernant l'ensemble des travaux ainsi que les perspectives qui en découlent sont présentées dans la cinquième section « ***Discussion et perspectives*** ». Enfin, mes compétences en laboratoire, mon parcours, mes travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de contrats privés ou de collaborations, mes missions d'enseignements et mes participations aux congrès sont présentés dans la sixième section « ***Annexes*** ».

Etude Bibliographique

I. Les lipoprotéines et l'athérosclérose

Les lipides et en particulier le cholestérol ont une grande place dans l'homéostasie de notre organisme. Ils participent à plusieurs fonctions distinctes. On peut, par exemple, citer leur rôle dans la constitution des membranes, des gaines de myélines, leur fonction dans le système endocrine avec les hormones stéroïdes, leur implication dans la signalisation cellulaire et leur rôle dans le métabolisme énergétique (Ikonen, 2008). Une dérégulation de l'homéostasie du cholestérol ou des mutations sur des gènes impliqués dans ce métabolisme peut entrainer des complications telles que l'athérosclérose. L'aboutissement de ces complications est généralement l'apparition de maladies de surcharges métaboliques et d'évènements cardiovasculaires. Afin de réguler les taux circulants de cholestérol, certaines molécules hypolipémiantes comme les statines, l'ézétimibe ou nouvellement les inhibiteurs de PCSK9 peuvent être utilisées.

1. Les lipoprotéines

Les lipides sont des molécules généralement insolubles dans les solutions aqueuses comme l'eau, le sang ou le plasma. Afin de pouvoir assurer leurs différentes fonctions au sein de l'organisme, les lipides doivent être transportés. Ils sont alors complexés à des entités protéiques amphiphiles, les apolipoprotéines (Apo), formant ainsi les lipoprotéines solubles dans les milieux aqueux (Feingold and Grunfeld, 2000). Les apolipoprotéines participent également au maintien de la structure, de la stabilité des lipoprotéines. Elles jouent un rôle clé dans la reconnaissance des lipoprotéines par leurs récepteurs et par les enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines (Dominiczak and Caslake, 2011; Feingold and Grunfeld, 2000).

Les particules de lipoprotéines sont formées d'un cœur lipidique constitué de lipides non polaires, principalement des esters de cholestérol, des triglycérides et des vitamines liposolubles A, D, E et K. Le revêtement du cœur lipidique est constitué d'une monocouche amphiphile composée de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines **(Figure 2)** (Brewer, 1981; Feingold and Grunfeld, 2000). Les lipoprotéines du plasma sont réparties en plusieurs classes en fonction de leur densité, taille, composition en lipides et protéines. La densité des particules de lipoprotéines est principalement déterminée par la quantité de lipides par particule **(Tableau 1)** (Gotto et al., 1986).

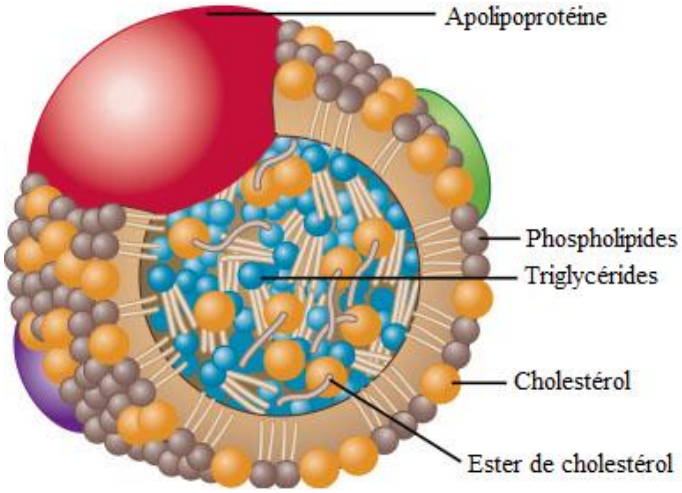


Figure 2 : Représentation d'une particule de lipoprotéine (extraite et traduite de medicine.academic.ru). Les lipides ne peuvent pas circuler librement dans le plasma. Les lipoprotéines sont des complexes protéines/lipides qui permettent le transport des lipides. Ce sont des particules constituées d'apolipoprotéines, de phospholipides, de triglycérides, de cholestérol libre et estérifié et de vitamines liposolubles.

Lipoprotéines	***Densité (g/ml)***	***Taille (nm)***	***Lipides majoritaires***	***Apolipoprotéines principales***
Chylomicrons	<0,930	75-1200	Triglycérides	Apo B48, Apo C, Apo E, Apo A1, Apo A2, Apo A4
Remnants de chylomicrons	0,930-1,006	30-80	Triglycérides, cholestérol	Apo B48 et Apo E
VLDL	0,930-1,006	30-80	Triglycérides	Apo B100, Apo E, Apo C
IDL	1,006-1,019	25-35	Triglycérides, cholestérol	Apo B100, Apo E, Apo C
LDL	1,019-1,063	18-25	Cholestérol	Apo B100
Lp(a)	1,055-1,085	30	Cholestérol	Apo B100 et Apo (a)
HDL	1,063-1,210	5-12	Cholestérol, phospholipides	Apo A1, Apo A2, Apo C, Apo E

Tableau 1 : Classification des lipoprotéines (adaptée de Feingold and Grunfeld, 2000). Les lipoprotéines peuvent être classées en fonctions de leur taille, densité et composition en lipides et protéines. Ainsi, les particules les moins denses sont les chylomicrons et les plus denses sont les HDL.

La voie exogène – Une partie importante du cholestérol de notre organisme vient de l'alimentation. Une étude réalisée en 1995 sur 6 patients hypercholestérolémiques a montré que l'inhibition pharmacologique de l'absorption du cholestérol intestinal diminue de 36% le taux de cholestérol plasmatique (Gylling and Miettinen, 1995). En effet, après une prise alimentaire, le cholestérol est absorbé au niveau du transporteur NPC1L-1 (Niemann-Pick C1-Like 1) des entérocytes (Altmann et al., 2004). Une fois à l'intérieur des entérocytes, le cholestérol et les acides gras absorbés sont orientés vers le réticulum endoplasmique (RE). Le cholestérol est estérifié par l'ACAT (Acyl-CoA Cholesterol Acyl Transferase) et les acides gras servent de substrat au mono- et di-acylglycerol acyltransferases pour former les triglycérides (Hui and Howles, 2005). Les esters de cholestérol, les triglycérides et les phospholipides sont ensuite transférés à l'Apo B48 par la MTTP (microsomal triglyceride transfer protein) pour former des pré-chylomicrons. D'autres apolipoprotéines comme l'Apo A1, A4 et C3 sont également

ajoutées à la particule en formation (Gordon et al., 1995). Les Dr. Sabesin et Frase ont montré dans des intestins de rat qu'après export vers l'appareil de Golgi, les pré-chylomicrons se chargent en triglycérides et sont ensuite exocytés dans la lymphe (Sabesin and Frase, 1977). Une fois dans la circulation, il y a un échange d'apolipoprotéines entres les pré-chylomicrons et les HDL (High Density Lipoprotein. Ainsi, les pré-chylomicrons deviennent matures en acquérant les Apo E et C2 et en cédant l'Apo A1 **(Figure 3)**. (Havel et al., 1973; Linton et al., 2000).

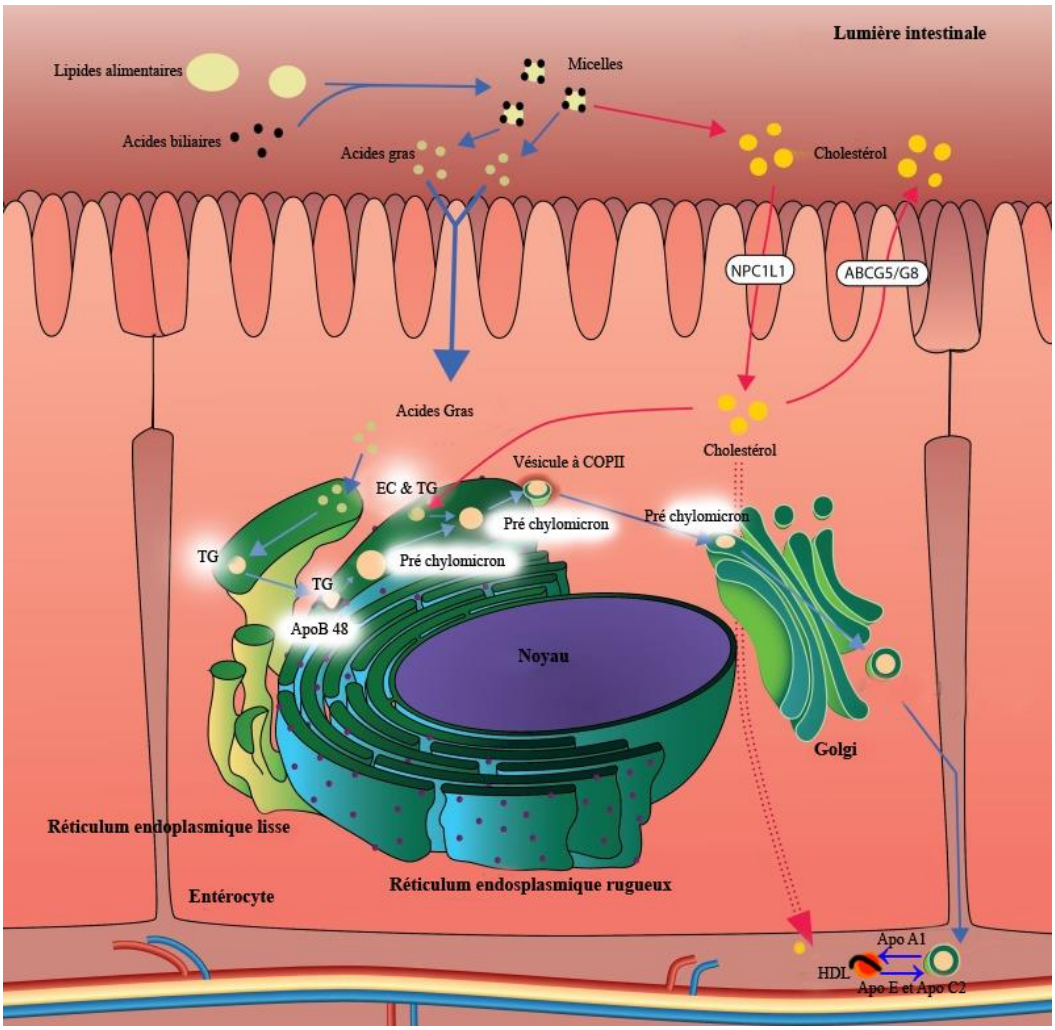


Figure 3 : Synthèse des chylomicrons après une prise alimentaire (extraite, traduite et adaptée de Linton et al., 2000). Après une prise alimentaire, le cholestérol est absorbé au niveau des cellules intestinales par le transporteur NPC1L-1. Les acides gras entrent passivement dans

les entérocytes. La synthèse de pré-chylomicrons prend place dans le RE et ensuite dans le Golgi. Une série de réactions enzymatiques incorpore les lipides dans les particules en formation. Une fois sécrétés dans la circulation, les pré-chylomicrons deviennent matures grâce à un échange d'apolipoprotéines avec les HDL.

Les chylomicrons matures sont pris en charge par une enzyme, la lipoprotéine lipase (LPL), que l'on retrouve au niveau des cellules endothéliales des muscles et des tissus adipeux. L'Apo C2 présente à la surface des chylomicrons matures active la LPL. L'enzyme hydrolyse les triglycérides en acides gras et glycérol qui sont utilisés par les tissus musculaires ou stockés dans les tissus adipeux. Lors de l'activation de la LPL, les chylomicrons perdent leur Apo C2. Il en résulte la formation de rémnants de chylomicrons (Goldberg, 1996). La perte des triglycérides et de l'Apo C2 induit un enrichissement des rémnants de chylomicrons en Apo E et les oriente vers le foie au niveau duquel ils se lient à différents récepteurs, notamment le LDLR et le LRP (LDLR Related Protein). En effet, une étude sur des souris déficientes pour l'Apo E a montré que celle-ci était nécessaire pour la reconnaissance et la dégradation des rémnants de chylomicrons par les récepteurs aux LDL (Low Density Lipoprotein) au niveau des hépatocytes (Zhang et al., 1992). Les lipides des rémnants de chylomicrons sont dégradés en acides gras et cholestérol libres pour la synthèse éventuelle des VLDL (Very Low Density Lipoprotein) (Daniels et al., 2009). L'ensemble de ce processus forme la voie exogène du cholestérol.

La voie endogène – L'assemblage des VLDL se déroule au niveau du réticulum endoplasmique rugueux des hépatocytes. La MTTP présente à ce niveau se lie à l'Apo B100, apolipoprotéine majeure des VLDL, en cours de synthèse et y transfère des triglycérides, des phospholipides et des esters de cholestérol. Cette réaction favorise le repliement de l'Apo B100 néo-synthétisée autour d'un cœur lipidique (Hebbachi and Gibbons, 2001; Daniels et al., 2009). La particule formée migre vers le Golgi et acquiert des lipides supplémentaires principalement des

triglycérides (Gibbons et al., 2000). Une fois dans la circulation, les VLDL échangent l'Apo C2 et l'Apo E avec les HDL. Comme pour les chylomicrons, les triglycérides des VLDL servent de substrats pour la LPL des muscles et du tissu adipeux. En perdant l'Apo C2, les VLDL deviennent des IDL (Intermediate Density Lipoprotein). L'Apo B100 des IDL peut être reconnue par le LDLR au niveau hépatique causant son élimination (Kobayashi et al., 1996). Les IDL peuvent également subir un cycle de lipolyse supplémentaire de leurs TG catalysé par la lipase hépatique et former ainsi les LDL (Low Density Lipoprotein) enrichies en Apo B100 et en ester de cholestérol (Ginsberg, 1994). Les niveaux de LDL plasmatiques sont déterminés par la production et la clairance des LDL et donc par l'abondance du récepteur aux LDL au niveau hépatique. En effet, le taux de synthèse des LDL est dépendant du taux de captage des IDL par les LDLR ; plus les IDL sont captées et moins les LDL sont produites (Feingold and Grunfeld, 2000; Goldstein and Brown, 2015). Parallèlement, 70% des LDL circulantes sont captées par les LDLR au niveau hépatique. Les LDL qui ne sont pas prises en charge par le foie sont acheminées au niveau des tissus périphériques. Il s'agit de la voie endogène **(Figure 4)**. Un excès de LDL-C dans la circulation entraine la formation de plaques d'athérome à l'origine de l'apparition de complications vasculaires.

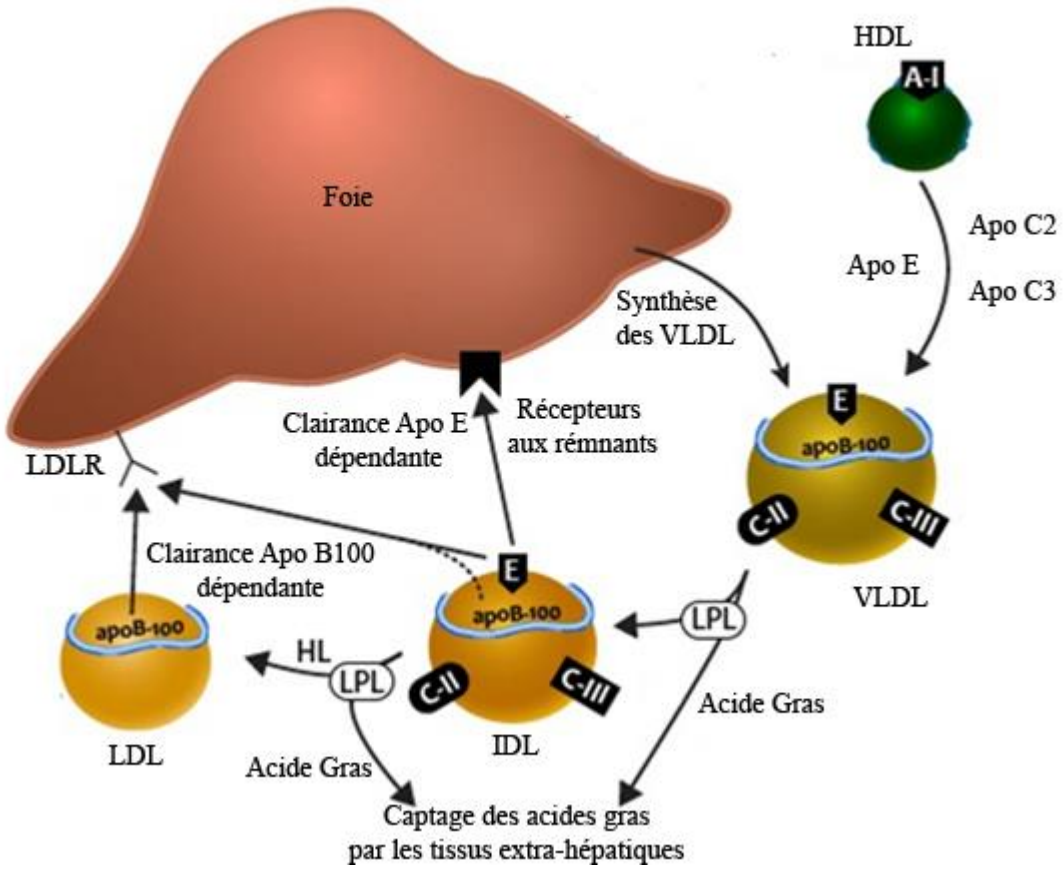


Figure 4 : La voie endogène du cholestérol (extraite, adaptée et traduite de Linton et al., 2000). Après captage des rémnants de chylomicrons au niveau du foie, les lipides sont dégradés en acides gras et cholestérol libre utilisés pour la synthèse de VLDL. Au niveau du RE, la MTTP assure le transfert de ces lipides vers l'Apo B100. Dans le Golgi, les néo-particules acquièrent des triglycérides, phospholipides et esters de cholestérol. Une fois dans la circulation, il y a un échange d'Apo avec les HDL. Les VLDL matures sont ensuite hydrolysées par la LPL dans les muscles et tissus adipeux. Les VLDL perdent leurs Apo et sont converties en IDL. Les IDL subissent un cycle de lipolyse supplémentaire par la lipase hépatique et forment les LDL. Les LDL riches en ester de cholestérol sont captées par le LDLR à 70%. Le reste est acheminé au niveau des tissus extra-hépatiques.

Le transport inverse – L'Apo A1, protéine majeure des HDL (High Density Lipoprotein) est synthétisée au niveau du foie et de l'intestin à hauteur de 70% et 30%, respectivement. Après sa sécrétion, l'Apo A1 génère des HDL discoïdales en interagissant avec le transporteur

ABCA1 (ATP Binding Cassette A1) à la surface des hépatocytes, des entérocytes et des cellules en périphérie telles que les cellules musculaires ou les adipocytes (Castro and Fielding, 1988). La liaison de l'Apo A1 au transporteur favorise un efflux de phospholipides et de cholestérol libre des cellules vers les HDL discoïdales. Ces HDL discoïdales sont aussi appelées des préβ-HDL en raison de leur migration électrophorétique (Wang et al., 2000). Le cholestérol libre et les phospholipides provenant de la lipolyse des chylomicrons et des VLDL peuvent également s'intégrer au préβ-HDL. La maturation des préβ-HDL en HDL sphériques matures nécessite l'estérification du cholestérol libre présent en surface. La LCAT (Lécithine Cholestérol Acyl Transférase), catalyse le transfert d'un acide gras des phospholipides au cholestérol libre. L'ester de cholestérol ainsi formé migre vers le cœur de la particule de HDL qui devient mature (Fielding et al., 1972). Une autre enzyme, la CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) est capable de transférer les esters de cholestérol des HDL vers les lipoprotéines à Apo B en échange de triglycérides (Pattnaik et al., 1978). Le cholestérol des HDL est majoritairement délivré au foie. En effet, les HDL matures se lient au récepteur SR-BI (Scavenger receptor class B type 1) au niveau des hépatocytes et le cholestérol est internalisé et transformé en acide biliaire. Les HDL appauvries en cholestérol estérifié retournent dans la circulation sous forme de préβ-HDL (Feingold and Grunfeld, 2000; Martinez et al., 2000) **(Figure 5)**. C'est le transport inverse du cholestérol.

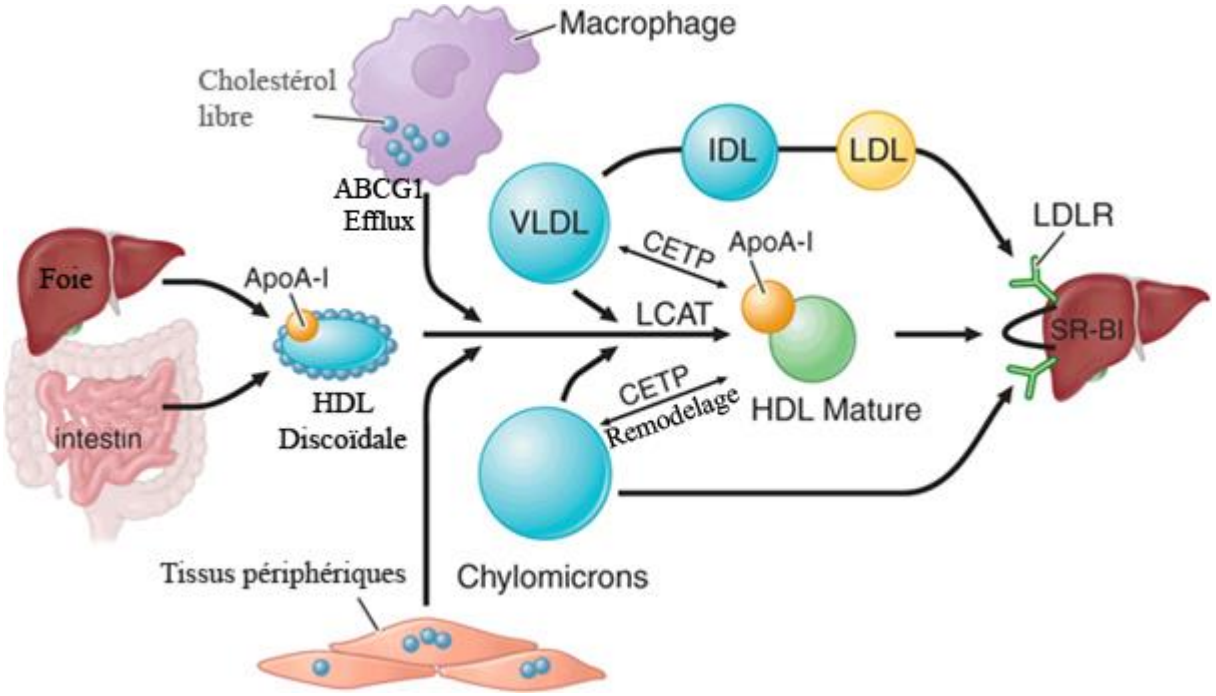


Figure 5 : Le transport inverse du cholestérol (extraite, adaptée et traduite de Rader and Hobbs, 2016). L'Apo majeure des HDL, l'Apo A1, est synthétisée au niveau du foie et de l'intestin. Sa reconnaissance par ABCA1 après sécrétion au niveau du foie induit un transfert de lipides et la formation d'HDL discoïdales. Lors de la liaison de l'Apo A1 à ABCA1, il y a un transfert de phospholipides et de cholestérol libre provenant des cellules vers la particule. Le cholestérol libre et les phopholipides peuvent également provenir des VLDL et des chylomicrons. La formation de HDL mature nécessite l'estérification du cholestérol libre par la LCAT. Une autre enzyme, la CETP catalyse le transfert des ester de cholestérol des HDL vers les lipoprotéines à Apo B en échange de triglycérides. Les HDL matures sont reconnues au niveau du foie par le récepteur SR-BI. Le cholestérol est internalisé et transformé en acide biliaire. Les HDL sont recyclées dans la circulation sous forme de préβ-HDL.

Les lipoprotéines et leurs récepteurs jouent un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie lipidique. Chez l'Homme la majeure partie du cholestérol des HDL est transférée vers les LDL par la CETP et est captée au niveau du foie par le LDLR. Le LDLR est ainsi au centre du

métabolisme des lipides chez l'Homme. Une dérégulation de ce métabolisme peut entrainer la survenue de maladies cardiovasculaires et de l'athérosclérose.

2. Les maladies cardiovasculaires et l'athérosclérose

Les maladies cardiovasculaires **–** Ces pathologies constituent la première cause de mortalité dans le monde et touchent principalement le cœur et les vaisseaux sanguins. En 2015, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a estimé à 17,7 millions le nombre de décès liés aux maladies cardiovasculaires. Ce chiffre représente 31% de la mortalité mondiale (WHO, 2015). Les maladies cardiovasculaires regroupent les cardiopathies coronariennes, les maladies cérébrovasculaires, les artériopathies périphériques, les cardiopathies rhumatismales, les malformations cardiaques congénitales et les thromboses veineuses profondes ainsi que les embolies pulmonaires (WHO, 2015). Dans l'étude INTERHEAT publiée en 2004, 12461 patients ayant fait un évènement vasculaire ont été recrutés dans 52 pays. Cette étude avait pour but d'identifier les facteurs de risques conduisant aux maladies cardiovasculaires. Une multitude de facteurs de risques a été reportée dont le diabète et les dyslipidémies (Yusuf et al., 2004; WHO, 2015). Ces dysfonctionnements du métabolisme des lipoprotéines peuvent conduire à des complications vasculaires. L'athérosclérose se caractérise par une rétention, modification et oxydation des lipides dans l'intima de certaines artères pouvant conduire à une sténose ou une thrombose (Insull, 2009). Dans les pays développés, l'athérosclérose est la cause principale de l'infarctus du myocarde et de l'accident vasculaire cérébral (Mozaffarian et al., 2015). Il s'agit d'une pathologie continue de lésions artérielles principalement due à la rétention de lipoprotéines et définie par une série de changement histologique de l'artère (Pahwa and Jialal, 2019).

Les vaisseaux sanguins sont constitués de trois couches distinctes. De l'extérieur vers l'intérieur se trouvent l'adventice, la média, et l'intima **(Figure 6)** (Taki et al., 2017). L'athérosclérose est

une altération progressive de l'intima de certaines artères (coronaires, carotides, aortes, artères jambières).

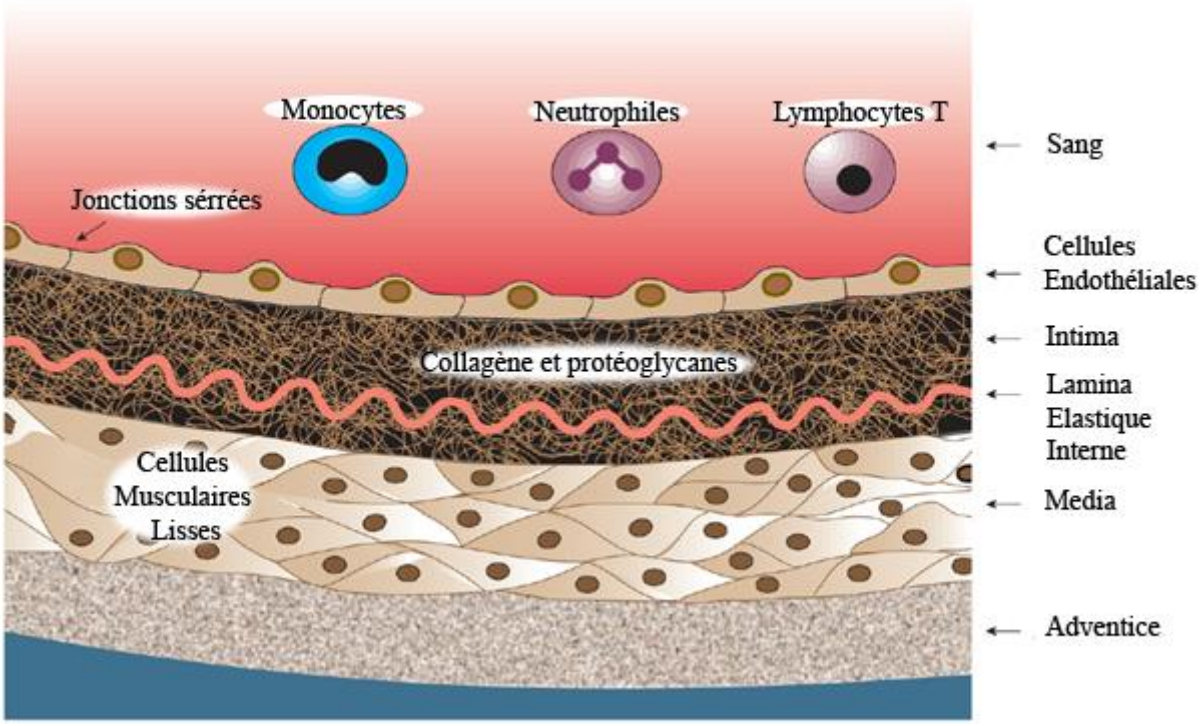


Figure 6 : Schéma de la structure d'une artère saine (extraite et traduite de Lusis, 2000). Les vaisseaux sanguins sont constitués de 3 couches distinctes. De l'extérieur vers l'intérieur se trouvent l'adventice, la média et l'intima. L'adventice est un tissu riche en collagène irrigué par la vasa vasorum. La média est la couche intermédiaire composée principalement de cellules musculaires lisses (CML) et d'élastine. L'intima est la couche la plus interne. Elle est constituée d'une couche d'élastine et de cellules endothéliales, principalement.

Formation de la strie lipidique – Les cellules endothéliales de l'intima des artères sont liées par des jonctions serrées qui assurent l'imperméabilité entre le sang et les tissus (Lusis, 2000). Au niveau des courbures et des ramifications, les cellules endothéliales ne sont pas orientées. Cette absence d'orientation favorise une augmentation de la perméabilité aux macromolécules comme les LDL qui vont diffuser dans l'espace subendothélial de l'intima (Gimbrone, 1999). Les particules de LDL y sont retenues par des matrices de protéoglycanes grâce à des

interactions avec l'Apo B100 (Borén et al., 1998). Les myéloperoxidases, les lipoxygenases et les espèces réactives à l'oxygène présentes favorisent alors l'oxydation des LDL qui peuvent déclencher une réponse immunitaire innée (Linton et al., 2000; Lusis, 2000). Les LDLox présentes dans l'espace subendothélial sont phagocytées par les macrophages *via* les récepteurs scavengers, SRA (Scavenger receptor A) et CD36 (Cluster de différenciation 36) principalement (Gisterå and Hansson, 2017). Les récepteurs scavengers, à l'inverse du LDLR, ne sont pas régulés par les taux intracellulaire de cholestérol (Gisterå and Hansson, 2017). Ainsi, l'internalisation continuelle de LDLox par les macrophages et aussi par les cellules musculaires lisses (CML) conduit à la formation de cellules spumeuses. C'est l'initiation de la lésion et la formation de la strie lipidique **(Figure 7)** (Pahwa and Jialal, 2019).

Formation de la chape fibreuse – Les cellules endothéliales et les macrophages activés vont sécréter des molécules pro-inflammatoires, cytokines et chimiokines entretenant l'inflammation au niveau de la lésion. En réponse au PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) sécrété par les macrophages, les CML de la média vont sécréter des protéinases dont la métalloprotéinase 9 (Sodhi and Brown, 2019). Ces protéinases permettent la dégradation de la matrice extracellulaire et facilitent la migration des CML de la média vers l'intima (Mason et al., 1999). En effet, au niveau de l'intima, les CML vont acquérir un phénotype distinct de celui des CML de la média avec notamment une capacité proliférative augmentée (Hedin et al., 1989). Un des rôles des CML est de produire la matrice extracellulaire (Geng Yong-Jian and Libby Peter, 2002). Ces cellules sont également connues pour produire le tissu conjonctif au niveau des vaisseaux sanguins. Dans les vaisseaux sains, les CML sécrètent principalement du collagène fibrillaire de types 1 et 3. Cependant, au niveau d'une lésion athérosclérotique, les CML sécrètent majoritairement des protéoglycanes, des fibres de collagènes de type 1 éparses et de la fibronectine (Doran et al., 2008; Ross, 1999). Cette nouvelle matrice sécrétée est capable de retenir les lipoprotéines. Les protéoglycanes forment des interactions avec l'Apo B100 et

l'Apo E et retiennent les LDL. Lorsqu'elles y sont liées, les particules de LDL s'oxydent et sont prises en charge par les macrophages et les CML qui deviendront des cellules spumeuses gorgées en cholestérol. Cette formation de nouvelles cellules spumeuses aboutit au développement d'un cœur nécrotique. Celui-ci est composé de cellules spumeuses, de lymphocytes T, de débris de cellules nécrotiques et apoptotiques et de lipides extracellulaires. Les CML migrent autour de ce cœur nécrotique et le recouvrent. Ce processus de cicatrisation de l'artère constitue la chape fibreuse **(Figure 7)** (Lafont, 2003; Pahwa and Jialal, 2019).

Rupture de la plaque **–** En général, les évènements vasculaires ne sont pas dus à la taille de la plaque mais plutôt à la stabilité de la chape fibreuse. Celle-ci enveloppe le matériel hautement thrombogénique du cœur nécrotique et l'empêche d'entrer en contact avec les facteurs de coagulation présents dans la circulation sanguine. La rupture de la plaque exposerait le contenu du cœur nécrotique aux facteurs de coagulation provoquant la formation d'un thrombus qui obstruerait la lumière vasculaire et induirait ces incidents vasculaires (Chen Yung-Chih et al., 2016; Falk, 2006; Head et al., 2017). Plus la chape fibreuse est épaisse et plus la plaque est stable. Une plaque est considérée instable lorsqu'une partie de la chape à une épaisseur inférieure à 65µm avec peu de CML, lorsqu'il y a une grande infiltration de cellules inflammatoires, et/ou lorsque le cœur nécrotique fait plus de 40% du volume de la lésion (Chen Yung-Chih et al., 2016; Virmani et al., 2000). Des autopsies réalisées sur 800 patients décédés de maladies cardiovasculaires ont montré que 55%-60% des décès étaient dus à une rupture de la plaque, 30-35% à une érosion de la plaque et 2%-7% à des calcifications (Finn et al., 2010). Les principales causes de ruptures sont la sécrétion de métalloprotéinases qui vont dégrader la chape fibreuse, le stress de cisaillement important, la calcification des CML et le dépôt de fer (Pahwa and Jialal, 2019). La plaque d'athérome devient compliquée lorsqu'elle est sujette à la rupture **(Figure 7)**.

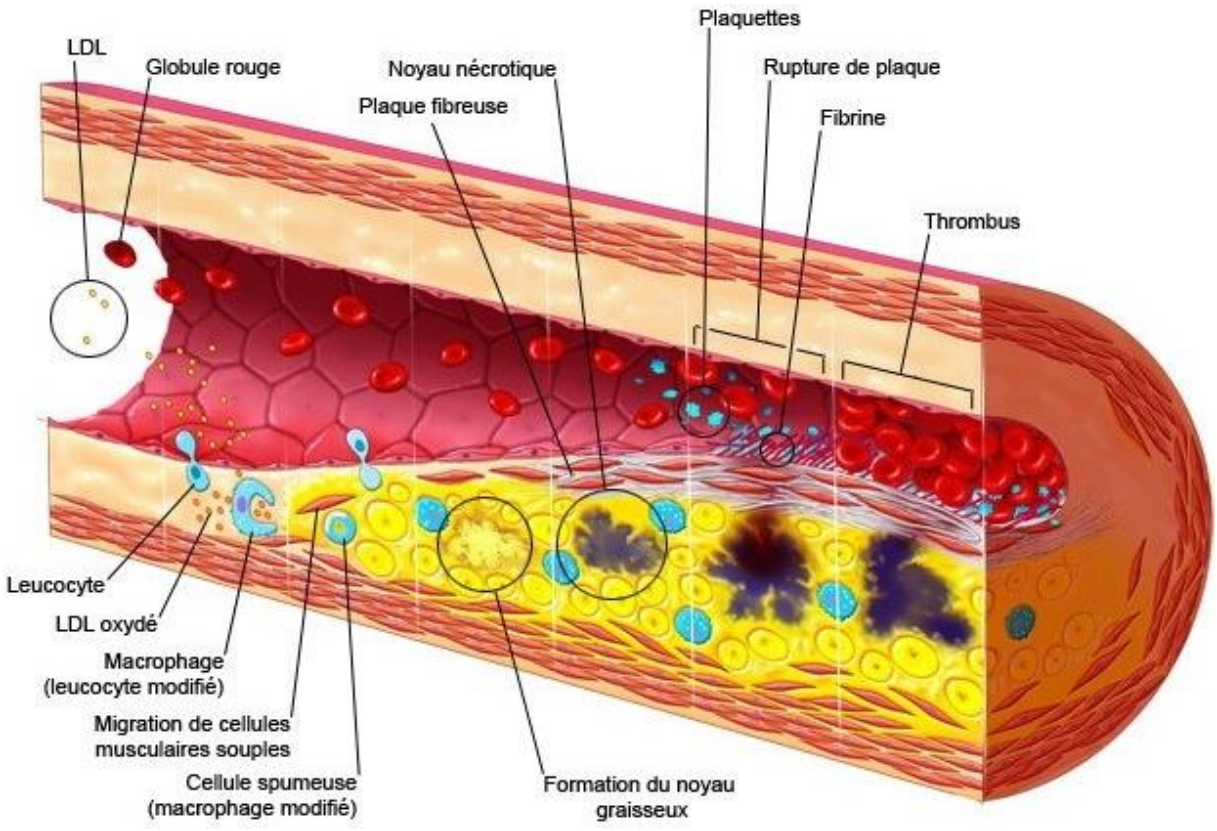


Figure 7 : Progression schématique du processus athéromateux (extraite de J. DIEBOLD Anatomie pathologique générale). L'initiation de l'athérosclérose débute avec l'internalisation de LDLox par les macrophages. En présence d'une quantité importante de LDLox, les macrophages s'engorgent en LDLox et se transforment en cellules spumeuses. C'est la formation de la strie lipidique. Les macrophages et cellules endothéliales activés sécrètent des cytokines pro-inflammatoires. Les CML sécrètent des protéases qui vont dégrader les matrices extracellulaires et favoriser leur migration vers l'intima. Au niveau de la lésion, les CML sécrètent des protéoglycanes, fibres de collagène et fibronectine capables de retenir les lipoprotéines. Ces lipoprotéines s'oxydent et sont prises en charge par les macrophages et les CML qui deviennent spumeuses formant ainsi le cœur nécrotique avec les lymphocytes T et débris cellulaires. Les CML migrent vers ce cœur nécrotique et le recouvrent pour former la chape fibreuse. La rupture de la chape fibreuse expose le contenu du cœur nécrotique au facteur de coagulation provoquant la formation d'un thrombus et la survenue d'accidents vasculaires.

Des facteurs génétiques peuvent favoriser l'apparition précoce de l'athérosclérose et des complications vasculaires. C'est le cas par exemple chez des individus hypercholestérolémiques familiaux. En 1997, une étude a révélé la présence de strie lipidique au niveau fœtal. Les fœtus de mères hypercholestérolémiques présentaient des stries lipidiques 7 à 12 fois plus sévères que ceux des mères normocholestérolémiques (Napoli et al., 1997).

3. L'hypercholestérolémie familiale et le récepteur aux LDL

L'hypercholestérolémie familiale est une maladie génétique autosomique dominante caractérisée par des taux de LDL-C circulants élevés. Elle est associée avec un risque de maladies cardiovasculaires prématurées (Marais, 2004; Nordestgaard et al., 2013). Le caractère génétique de la pathologie permet de faire la distinction entre la forme homozygote et la forme hétérozygote. Chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale homozygote (HoFH), les concentrations de cholestérol total varient entre 650mg/dL et 1000mg/dL (17mmol/L et 26mmol/L) et les concentrations de LDL-C sont supérieures à 600mg/dL (15,5mmol/L). Chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale hétérozygote (HeFH), les concentrations de cholestérol total varient entre 350mg/dL et 550mg/dL (9mmol/L et 14mmol/L) et celles de LDL-C sont comprises entre 200mg/dL et 400mg/dL (5mmol/L et 10mmol/L) (European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation et al., 2011; Hovingh et al., 2013). Ces taux élevés de LDL-C peuvent favoriser l'apparition de signes cliniques externes comme les xanthomes tendineux ou les arcs cornéens (Hovingh et al., 2013). La prévalence de l'hypercholestérolémie familiale homozygote a été initialement estimée à 1 :1 000 000 dans la population générale. Celle de la forme hétérozygote a été estimée à 1 :500. Néanmoins, des analyses plus récentes estiment des prévalences plus importantes qui varient en fonction des populations étudiées **(Tableau 2)**. Ces différences s'expliquent, notamment, par l'absence de

méthode de diagnostic universelle pour l'hypercholestérolémie familiale (Mytilinaiou et al., 2018).

Country/Ethnic population [References]	HeFH prevalence rate
United States 1973 (Goldstein et al., 1973)	1:500
United States 2016, SEARCH Study (Safarova et al., 2016)	1:310
United States 2016, NHANES Study (de Ferranti et al., 2016)	1:250
Québécois French Canadians (Moorjani et al., 1989)	1:270
Tunisia (Slimane et al., 1993)	1:165
Finnish North Karelia (Vuorio et al., 1997)	1:441
Hungary (Kalina et al., 2001)	1:538
United Kingdom (Austin et al., 2004)	1:623
Denmark (Benn et al., 2012)	1:137
Catalan (Zamora et al., 2017)	1:192
Australia (Pang et al., 2016)	1:267
Japan (Mabuchi et al., 1977)	1:900
China (Zhou and Zhao, 2016)	1:212–1:357
Lebanon (Austin et al., 2004)	1:85
South Africa/Afrikaners (Steyn et al., 1996)	1:72
Ashkenazi Jews (Seftel et al., 1989)	1:67
West Siberian (Russian Federation) (Ershova et al., 2017)	1:108
Country/Ethnic population [References]	**HoFH prevalence rate**
Netherlands (Dutch) (Sjouke et al., 2015)	1:300,000
Catalan (Zamora et al., 2017)	1:425,774
Spain (Sanchez-Hernandez et al., 2016)	1:450,000
Québécois French Canadians (Moorjani et al., 1989)	1:275,000

Tableau 2 : Prévalence de l'hypercholestérolémie familiale hétérozygote et homozygote dans différentes régions (extrait de Mytilinaiou et al., 2018). La prévalence de l'hypercholestérolémie varie en fonction des populations étudiées. Ce tableau résume les prévalences établies dans la littérature pour l'hypercholestérolémie familiale homo- et hétérozygote.

Il existe plusieurs algorithmes permettant le diagnostic de l'hypercholestérolémie familiale. Il s'agit pour la plupart d'un système basé sur un score. Bien que différents, ces algorithmes

fournissent des prédictions relativement similaires. Les méthodes de diagnostic les plus utilisées sont le « MEDPED and WHO » (Make Early Diagnosis to Prevent Early Death and World Health Organization), le « Simon Broome system », le « Dutch Lipid Network Criteria », le « National Lipid Association » et le « Japanese FH diagnostic criteria » (European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation et al., 2011; Mytilinaiou et al., 2018).

Les premières associations entre les morts subites et la présence de xanthomes tendineux ont été faites entre 1925 et 1938. L'observation microscopique des cellules provenant des xanthomes a révélé la présence de cellules spumeuses plus engorgées en lipide que dans une plaque d'athérome. En 1939, après études de 17 familles, l'aspect héréditaire de l'hypercholestérolémie familiale est apparu (Marais, 2004; Ose, 2002). En 1972, les Pr. Brown et Goldstein ont élucidé les origines moléculaires de cette maladie. Leurs travaux les ont mené à la découverte du récepteur aux LDL récompensée par l'obtention du prix Nobel de physiologie et médecine en 1985 (Goldstein and Brown, 2009). Ils ont tout d'abord mesuré l'activité d'une enzyme clé de la synthèse endogène de cholestérol, la 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A réductase (HMGCR), issue de cultures de fibroblastes humains d'individus sains. Cette enzyme est régulée de façon négative par le cholestérol. L'ajout aux cultures d'une fraction de VLDL ($\rho<1{,}006$), ou de 2 fractions différentes de LDL ($1{,}006<\rho<1{,}019$ et $1{,}019<\rho<1{,}063$), isolées par ultracentrifugation sur gradient de bromure de potassium, a induit une diminution de l'activité de l'HMGCR de ces cellules (Brown et al., 1973). L'ajout d'une fraction de HDL ($1{,}063<\rho<1{,}210$) n'a eu aucun effet. Les 2 lipoprotéines (LDL et HDL) étaient connues pour transporter le cholestérol. Ainsi, l'absence d'effet des HDL sur l'enzyme a suggéré l'implication d'un récepteur (Brown et al., 1973; Goldstein and Brown, 2009). Un autre indice de l'existence d'un récepteur a été la haute affinité des particules de LDL qui ont agi à 10^{-9}mol/L sur l'activité de l'enzyme (Goldstein and Brown, 2009). Ensuite,

en cultivant des fibroblastes de patients HoFH, les Pr. Brown et Goldstein se sont aperçus que l'activité de l'HMGCR était 50 à 100 fois supérieure à celle observée avec les fibroblastes d'individus sains. En revanche, après ajout de LDL ou de sérum, son activité enzymatique n'a pas varié. Ces résultats ont suggéré qu'une mutation de l'enzyme serait à l'origine de l'hypercholestérolémie familiale (Goldstein and Brown, 1973, 2009). Cette hypothèse fut réfutée par eux-mêmes lorsqu'ils ont fait rentrer dans les fibroblastes de patients HoFH du cholestérol solubilisé dans de l'éthanol par adsorption à la membrane plasmique et pu observer une diminution de l'activité de HMGCR (Brown et al., 1974; Goldstein and Brown, 2009). La découverte du récepteur a finalement été réalisée en 1974. Des fibroblastes provenant d'individus sains ou de patients hypercholestérolémiques homozygotes ont été traités avec des LDL marquées à l'iode 125. Les cellules saines ont présenté une haute affinité pour les LDL marquées contrairement aux cellules provenant de patients hypercholestérolémiques **(Figure 8)**. Ils ont pu ainsi identifier qu'un défaut génétique sur le gène codant pour un récepteur aux LDL serait une cause possible d'hypercholestérolémie familiale (Brown and Goldstein, 1974). Le récepteur aux LDL a été purifié en 1982 et le *LDLR* gène isolé en 1985 (Goldstein and Brown, 2009).

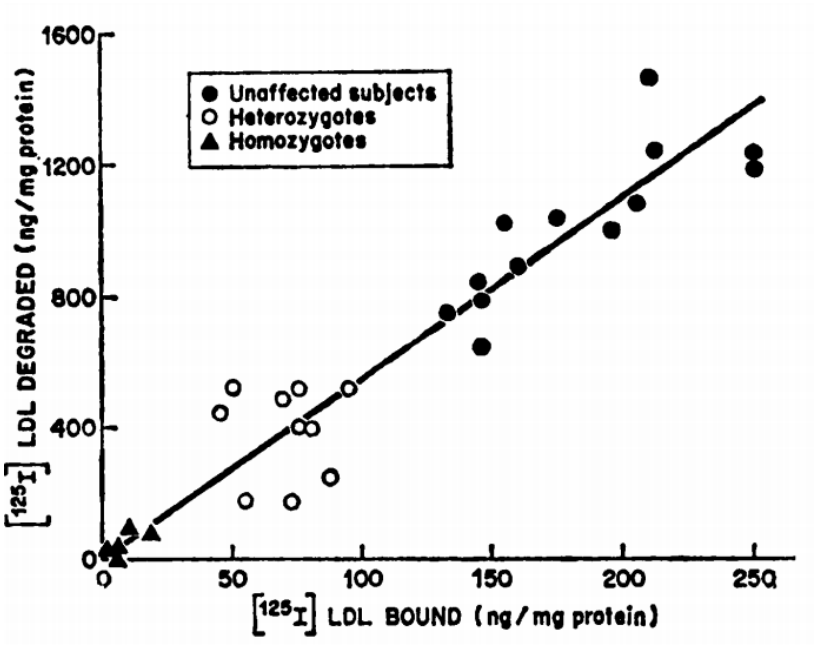


Figure 8 : Relation entre la liaison et la dégradation des LDL marquées à l'iode 125 chez des fibroblastes provenant d'individus atteints d'hypercholestérolémie familiale (extraite de Brown and Goldstein, 1974). Les fibroblastes d'individus HoFH ne lient et ne dégradent pas les LDL. Ceux des patients HeFH ont une liaison et une dégradation intermédiaire comparées à ceux des sujets sains.

A ce jour, plus de 1400 variants génétiques du gène du LDLR ont été identifiés comme étant pathogéniques (880) ou probablement pathogéniques (576) et la base de donnée de l'University College London récence 1707 mutations connues du LDLR (Leigh et al., 2017; ClinVar, 2019). Bien qu'il existe une multitude de mutations différentes sur le LDLR, celles-ci peuvent être classées en 5 groupes. La classification se fait en fonction des caractéristiques de la protéine mutante synthétisée et analysée (Hobbs et al., 1992; Varret and Rabès, 2012). Les mutations de classe 1 empêche la synthèse des LDLR (allèles nuls). Les mutations de classe 2 bloquent le passage des LDLR du RE au Golgi ou à la membrane plasmique. Les mutations de classe 3 aboutissent à la production de LDLR qui ne lient pas les LDL. Les mutations de classe 4 produisent des LDLR qui ne sont pas internalisés. Les mutations de classe 5 affectent le domaine cytoplasmique des LDLR et empêchent leur recyclage à la membrane **(Figure 9)** (Varret and Rabès, 2012). Parmi les 1707 mutations recensées dans la base de données Londonienne : 81% sont des classes 4 et 5 (n=800 et n=585, respectivement), 12% des classes 1 et 2 (n=26 et n=184, respectivement) et 7% de la classe 3 (n=112) (Leigh et al., 2017). L'espérance de vie en bonne santé est diminuée chez les patients hypercholestérolémiques familiaux. Les morts subites par infarctus sont fréquentes avant 55 ans (Marais, 2004).

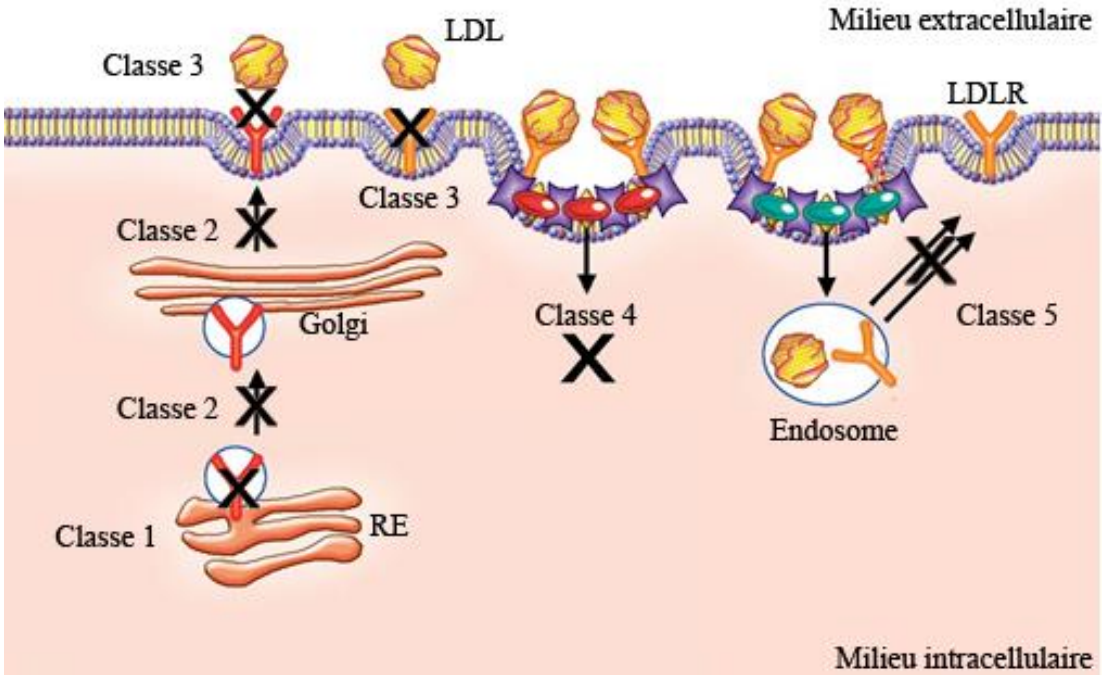


Figure 9 : Classes fonctionnelles des mutations sur le récepteur aux LDL (extraite, adaptée et traduite de Sniderman et al., 2014). Les mutations de classe 1 empêchent la synthèse des LDLR (allèles nuls). Les mutations de classe 2 bloquent le passage des LDLR du RE au Golgi ou à la membrane plasmique. Les mutations de classe 3 aboutissent à la production de LDLR qui ne lient pas les LDL. Les mutations de classe 4 produisent des LDLR qui ne sont pas internalisés. Les mutations de classe 5 affectent le domaine cytoplasmique des LDLR et empêchent leur recyclage à la membrane.

Selon la nature de la mutation, les phénotypes concernant la cholestérolémie sont plus ou moins sévères. Une dérégulation du métabolisme des lipides cause des dyslipidémies et entraîne l'apparition de maladies cardiovasculaires, un phénomène très prématuré chez les patients FH. Ainsi, il est impératif de réguler les taux de cholestérol circulant afin d'atteindre des valeurs seuils en fonction des facteurs de risques. Des stratégies pharmacologiques ont été mises en place afin de faire diminuer le taux de LDL-C circulant associé à l'apparition de maladies cardiovasculaires. Ce sont les médicaments hypolipémiants.

4. Les hypolipémiants

Les concentrations cibles en LDL-C **–** Les taux élevés en LDL-C constituent un facteur de risque majeur de la survenue de maladies cardiovasculaires (Silverman et al., 2016). L'augmentation de la concentration plasmatique de LDL-C est causative de l'apparition de l'athérosclérose (Borén and Williams, 2016). Il existe d'autres facteurs de risque comme l'âge, le sexe, le tabagisme, le diabète, l'hypertension artérielle, les antécédents familiaux, l'hypercholestérolémie familiale, l'insuffisance rénale et un évènement cardiovasculaire documenté. Ainsi, des valeurs seuils de LDL-C à atteindre ont été définies en fonction de ces facteurs de risques de maladies cardiovasculaires. Le système SCORE (Systematic Coronary Risk Estimation) qui tient compte du sexe, de l'âge, du tabagisme, de la pression artérielle systolique et de la cholestérolémie totale est utilisé pour estimer le risque d'apparition de maladies cardiovasculaires fatales sur 10 ans. Lorsque le score obtenu est supérieur à 10% l'individu peut être considéré à très haut risque. Lorsque le score obtenu est compris entre 5% et 10%, l'individu est considéré à haut risque. Le risque est modéré si l'individu obtient un score compris entre 5% et 1%. L'individu avec un score inférieur ou égal à 1% est considéré à bas risque d'apparition de maladies cardiovasculaires. Cet algorithme ne s'applique pas chez les patients avec un évènement vasculaire documenté, diabétiques, insuffisants rénaux, atteints d'hypercholestérolémie familiale ou avec une lipoprotéine (a) (Lp(a)) très élevée. Ces patients sont considérés automatiquement à très haut risque. D'après le score estimé, des stratégies différentes de prises en charge du patient sont mises en places. Ces stratégies concernent dans un premier temps la nutrition et l'activité physique pour les patients présentant un risque bas ou modéré. Pour les patients avec un haut ou très haut risque des traitements médicamenteux sont rajoutés. Ainsi, il est recommandé par l'ESC (European Society of Cardiology) d'atteindre des taux de LDL-C inférieurs à 55mg/dL chez les patients à très haut risque, inférieurs à

70mg/dL chez les patients à haut risque, inférieurs à 100mg/dL chez les patients à risque modéré et inférieur à 116mg/dL chez les patients à bas risque cardiovasculaire (Mach et al., 2019).

Le cholestérol plasmatique provient de sources différentes. Il peut être synthétisé dans presque tous les types cellulaires de l'organisme par une série de réactions enzymatiques comprenant 2 enzymes limitantes : l'HMGCR et la squalène monooxygenase. Le cholestérol peut aussi provenir de l'alimentation dans les produits d'origine animale (beurre, viandes, poissons, lait, œufs et produits dérivés). Dans ce cas, il est absorbé au niveau des entérocytes par le transporteur NPC1L-1. (Goldstein and Brown, 2009). On estime à 70% la part de cholestérol synthétisée et 30% la part de cholestérol apportée par l'alimentation. Dans le but de faire baisser les taux de LDL-C, plusieurs médicaments ont été élaborés comme les statines et l'ézétimibe.

Les statines **–** En 1953, l'équipe du Pr. Campbell a mis en évidence un effet du cholestérol alimentaire sur la synthèse endogène de cholestérol. Des chiots ont reçu une supplémentation en cholestérol dans leur alimentation pendant 7 jours. De l'acétate marqué au carbone 14 a également été rajouté à l'alimentation afin de suivre son incorporation dans le cholestérol néo-synthétisé. L'étude de sections de foie a révélé que l'ajout de cholestérol exogène diminue de façon drastique la synthèse endogène de cholestérol (Gould et al., 1953). Ensuite en 1960, l'équipe du Pr. Lynen a identifié l'enzyme HMGCR comme ayant un rôle clé dans la synthèse endogène de cholestérol (Bucher et al., 1960). Cette enzyme catalyse la réduction de l'HMG-CoA en mévalonate un précurseur du cholestérol. En 1964, les Pr. Lynen et Bloch ont reçu un prix Nobel pour leurs travaux sur la synthèse endogène de cholestérol. Plus tard, les Pr. Brown et Goldstein ont démontré avec des cultures de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary cells) que l'apport exogène de cholestérol induit une diminution de l'expression de l'HMGCR et également du LDLR dans ces cellules **(Figure 10)** (Goldstein and Brown, 1990).

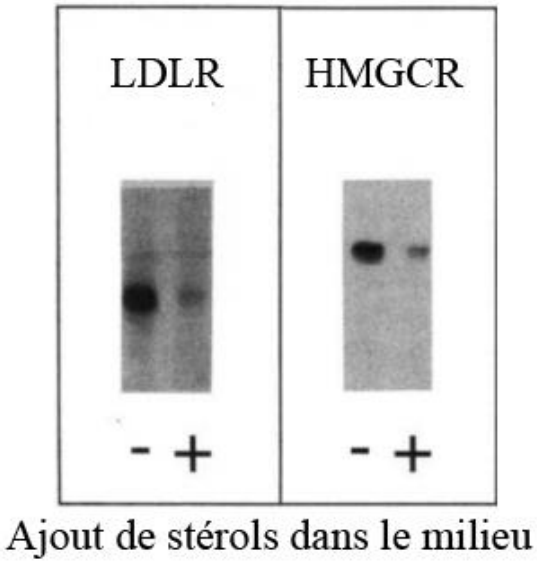


Figure 10 : Le cholestérol ajouté induit une diminution de l'abondance du LDLR et de l'HMGCR (extraite et adaptée de Goldstein and Brown, 1990). L'incubation de CHO pendant 24h en absence ou présence de stérols induit une diminution de l'expression du LDLR et de l'HMGCR.

Après la découverte du rôle majeur de l'HMGCR, des métabolites d'origine fongique ont été identifiés par le Pr. Endo pour leur capacité à induire une diminution significative de l'activité de l'HMGCR dans des cultures de fibroblastes humains. Ces molécules présentaient une homologie structurale avec le substrat de l'enzyme, l'HMG-CoA (Endo et al., 1976; Brown et al., 1978; Kaneko et al., 1978). Parmi ces métabolites, la compactine fut ensuite testée sur 11 patients atteints d'hypercholestérolémie familiale. Son administration à 50mg-150mg par jour a entrainé une diminution moyenne de 27% des taux de cholestérol circulants totaux **(Figure 11)** (Yamamoto et al., 1980). Ce fut la naissance de la première statine (Endo, 2010).

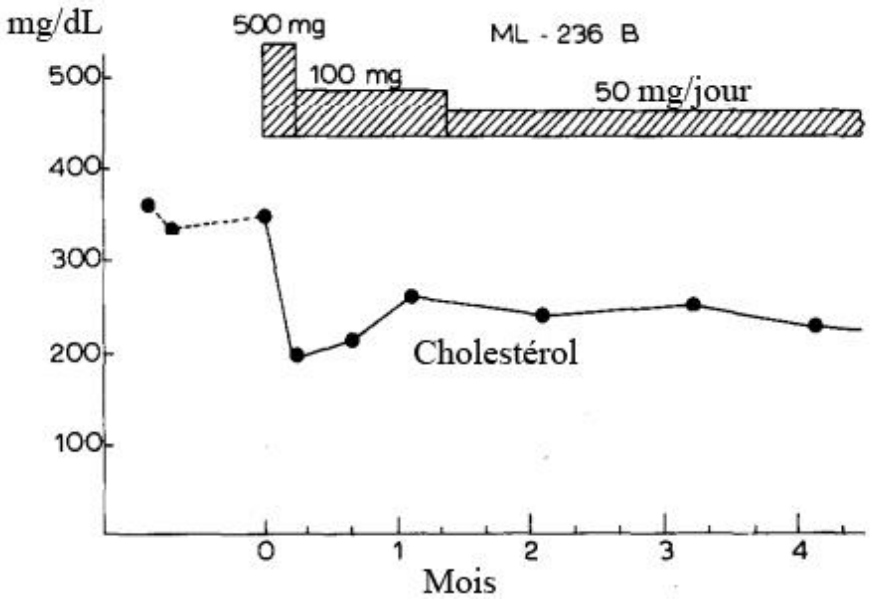


Figure 11 : La compactine induit une diminution du taux de cholestérol plasmatique (extraite et traduite de Yamamoto et al., 1980). L'administration de la compactine à une dose initiale de 500mg/jour pendant une semaine puis à des doses moindres a induit une diminution de 30% le cholestérol chez un patient HeFH.

Actuellement, il existe plusieurs statines. Les plus connues sont : l'atorvastatine, la lovastatine, la mévastatine, la simvastatine, la pitavastatine et la rosuvastatine. Plusieurs essais cliniques ont démontré l'efficacité des statines sur la réduction du LDL-C et également sur la réduction de la survenue des évènements cardiovasculaires. En effet, un traitement à la statine diminue en moyenne de 40% les maladies cardiovasculaires **(Figure 12)** (Rosenson and Tangney, 1998). On considère que la diminution de 1mmol/L des taux de LDL-C induite par une statine réduit de 21% la mortalité et la morbidité cardiovasculaire (Toth et al., 2018a).

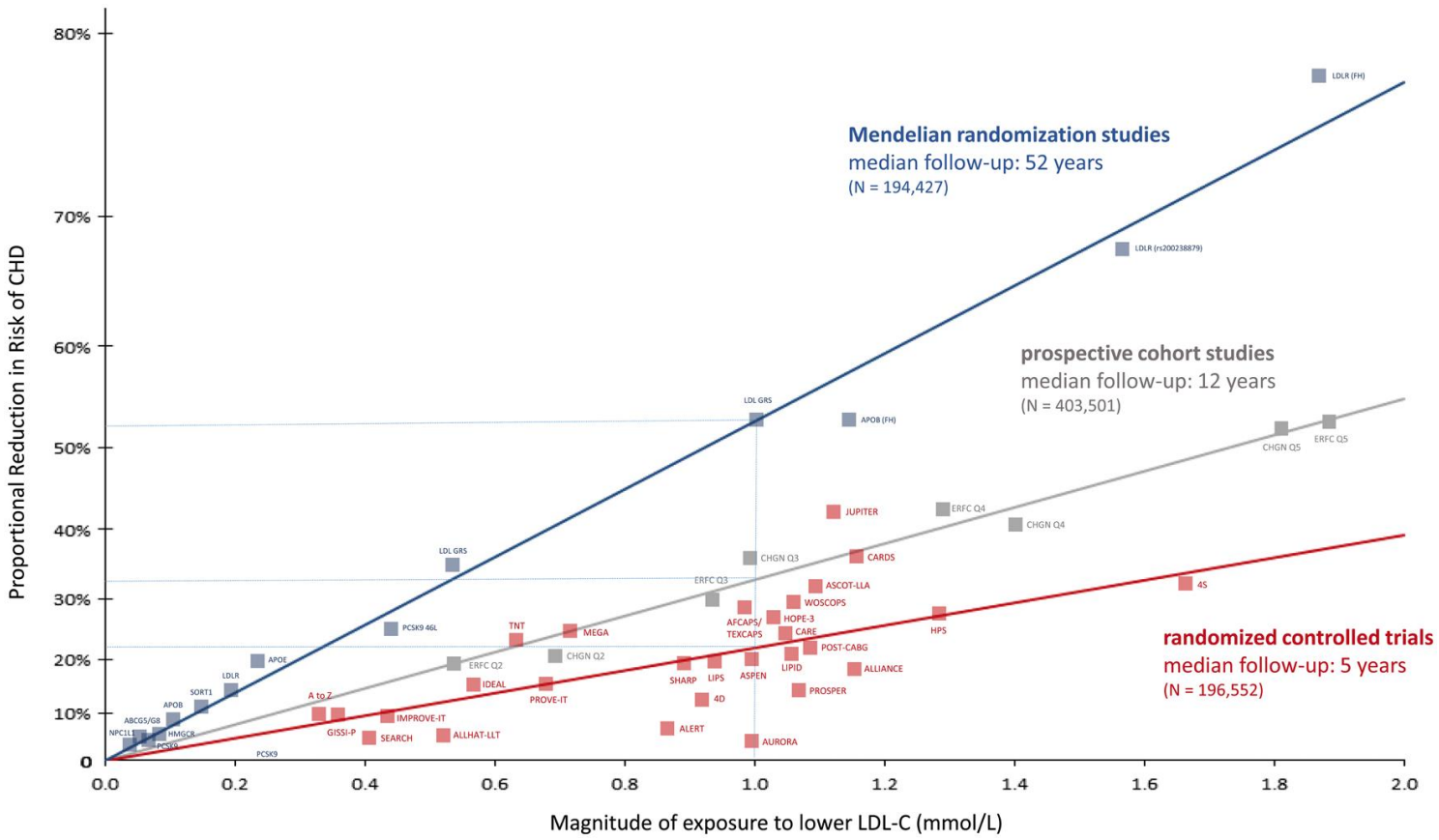


Figure 12 : Effets de la diminution du LDL-C sur l'incidence des maladies cardiovasculaires (extraite de Ference et al., 2017). Cette figure issue d'une méta-analyse montre l'effet de la réduction du taux de LDL-C sur le risque de maladie cardiovasculaire dans les études mendéliennes (droite bleue), les études prospectives (droite grise) et les essais cliniques (droite rouge).

Mode d'action des statines – Les statines sont des inhibiteurs de l'HMGCR. Elles altèrent la structure de l'enzyme et empêchent la synthèse endogène de cholestérol (Ma et al., 1986). L'expression du gène *HGMCR* est sous la dépendance du facteur de transcription SREBP-2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein). Des études du gène *LDLR* ont montré que celui-ci présente aussi un site de reconnaissance au SREBP-2 (Brown and Goldstein, 1997). En présence de cholestérol, le facteur de transcription SREBP-2 est ancré à la membrane du réticulum endoplasmique par le complexe protéique Insig-1/Scap (Insulin induced gene-1/SREBP cleavage activator protein). Ce complexe protéique constitue un senseur de la

concentration en cholestérol dans la membrane du RE. Lorsque celle-ci diminue, Scap se détache d'Insig-1 et entraîne SREBP-2 vers le Golgi dans une vésicule à COPII. Dans le Golgi, les protéases S1P et S2P clivent SREBP-2. SREBP-2 clivé est transloqué vers le noyau où il se fixe au promoteur et active l'expression de gènes cibles comme le *LDLR* **(Figure 13)** (Horton et al., 2002; Brown and Goldstein, 2009; Goldstein and Brown, 2009). En inhibant la synthèse endogène du cholestérol, les statines induisent une baisse de la concentration intracellulaire en cholestérol. Cette diminution aboutit à l'activation du facteur de transcription SREBP-2 entrainant l'expression du gène *LDLR*. La surexpression du LDLR favorise à son tour la diminution des taux de LDL-C plasmatiques.

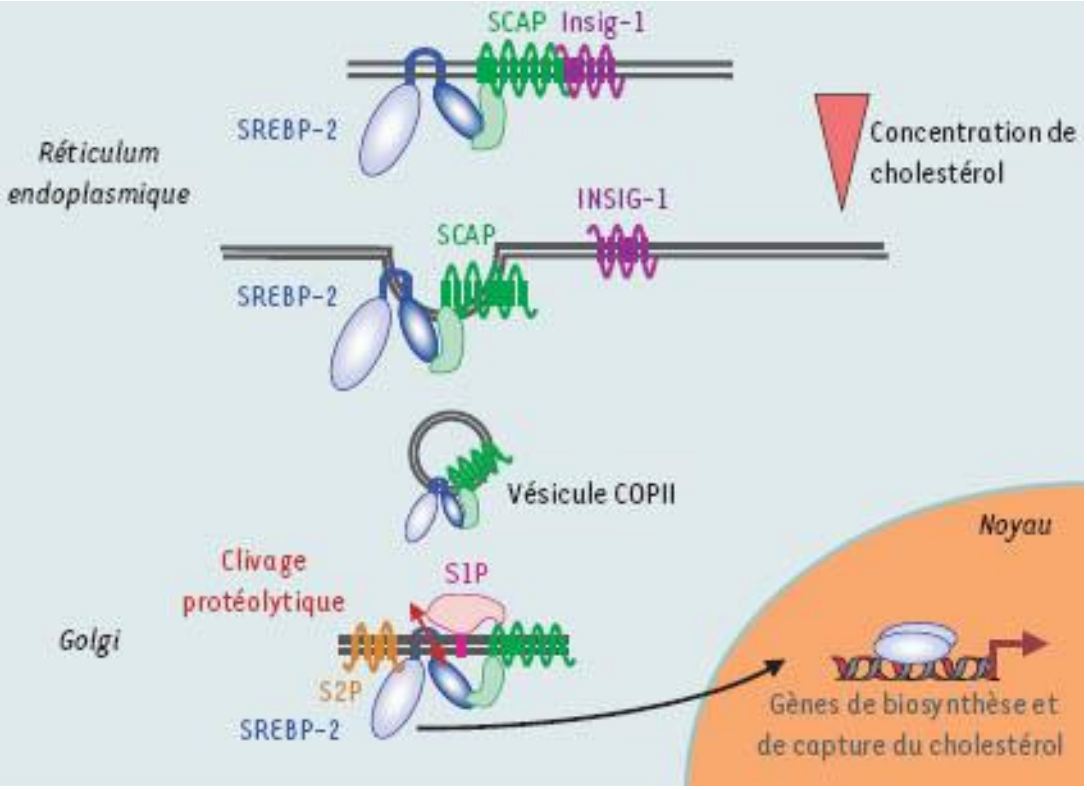


Figure 13 : Activation de SREBP-2 après déplétion en cholestérol (extraite de Foufelle et al., 2005). En présence de cholestérol, SREBP-2 est ancré à la membrane du RE par le complexe protéique Insig-1/Scap. Lorsque la concentration en cholestérol intracellulaire diminue, Scap se détache d'Insig-1 et entraîne SREBP-2 vers le Golgi dans une vésicule à COPII. Dans le

Golgi, les protéases S1P et S2P clivent SREBP-2. SREBP-2 clivé est transloqué vers le noyau où il se fixe au promoteur et active l'expression de gènes cibles comme le LDLR.

Les statines sont généralement sûres et bien tolérées. Cependant, certains patients sont intolérants aux statines. Les effets secondaires les plus fréquents sont les douleurs musculaires, crampes et dans des cas plus rares la survenue prématurée du diabète de type 2 chez des individus prédisposés (Toth et al., 2018a). Des traitements alternatifs sont élaborés afin de faire diminuer le taux de cholestérol circulant de ces patients.

L'ézétimibe **–** En 2004, l'équipe du Dr. Grazanio a mis en évidence NPC1L-1 une protéine de transport exprimée dans les entérocytes et au niveau des canalicules biliaires. NPC1L-1 possède un domaine senseur du cholestérol et facilite l'internalisation du cholestérol libre dans les entérocytes et la réabsorption du cholestérol biliaire (Altmann et al., 2004; Phan et al., 2012). Lorsque la concentration extracellulaire en cholestérol est élevée, NPC1L-1 capte le cholestérol. Le complexe est internalisé par endocytose et stocké dans des compartiments de recyclage de l'endocytose. Lorsque la concentration en cholestérol diminue, NPC1L-1 retourne à la membrane plasmique et capte de nouvelles molécules de cholestérol (Phan et al., 2012). L'ézétimibe est un composé chimique capable d'inhiber l'absorption intestinale et la réabsorption biliaire du cholestérol en bloquant NPC1L-1 (Rosenblum et al., 1998). Il empêche l'endocytose du transporteur **(Figure 14)**. Ce traitement est généralement prescrit en complément d'une statine.

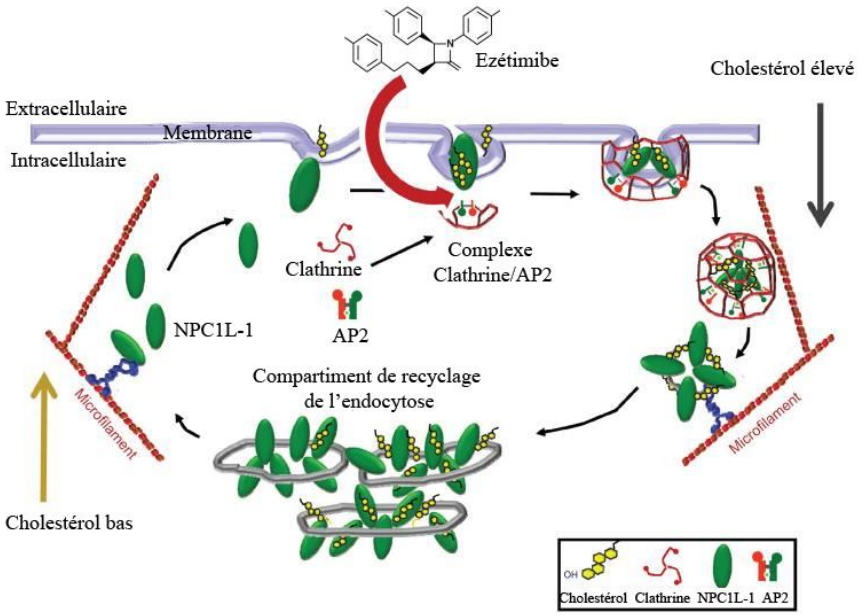


Figure 14 : Mode d'action de l'ézétimibe (extraite et traduite de Phan et al., 2012). L'ézétimibe est un inhibiteur compétitif du transporteur NPC1L-1. Il inhibe la réabsorption biliaire et intestinale du cholestérol en empêchant l'endocytose de NPC1L-1.

Dans une méta-analyse regroupant 27 essais cliniques, l'effet d'un traitement à 10mg d'ézétimibe en complément d'une statine a été évalué sur 21 000 patients. Les taux de LDL-C des patients sous statine seule ont diminué de 23,6%. La supplémentation du traitement statine par 10mg d'ézétimibe a induit une diminution plus marquée de 38,7% (soit 15,1% de baisse supplémentaire). Chez les sujets avec un évènement cardiovasculaire documenté, 10,3% des patients en monothérapie avec la statine ont atteint un LDL-C en dessous de 70mg/dL. La combinaison de la statine et de l'ézétimibe a permis à 32,1% (+21,8%) des patients d'atteindre ce seuil (Morrone et al., 2012). Dans l'étude IMPROVE-IT, 18 144 patients hospitalisés pour un évènement vasculaire ont été recrutés. Le point final de l'étude était la mort cardiovasculaire, les infarctus du myocarde non fatal et les angors après un suivi de 6 ans en moyenne. Ces patients étaient sous 40mg de simvastatine seule ou supplémentée avec 10mg d'ézétimibe. Parmi les patients sous simvastatine seule, 34,7% ont refait un évènement cardiovasculaire majeur. Dans le groupe de patients sous statine plus ézétimibe, 32,7% seulement ont refait un

évènement cardiovasculaire majeur **(Figure 15)**. L'ajout d'ézétimibe a diminué significativement de 2% les évènements cardiovasculaires. Le bénéfice de la supplémentation en ézétimibe apparaît après 1 an de traitement (Cannon et al., 2015).

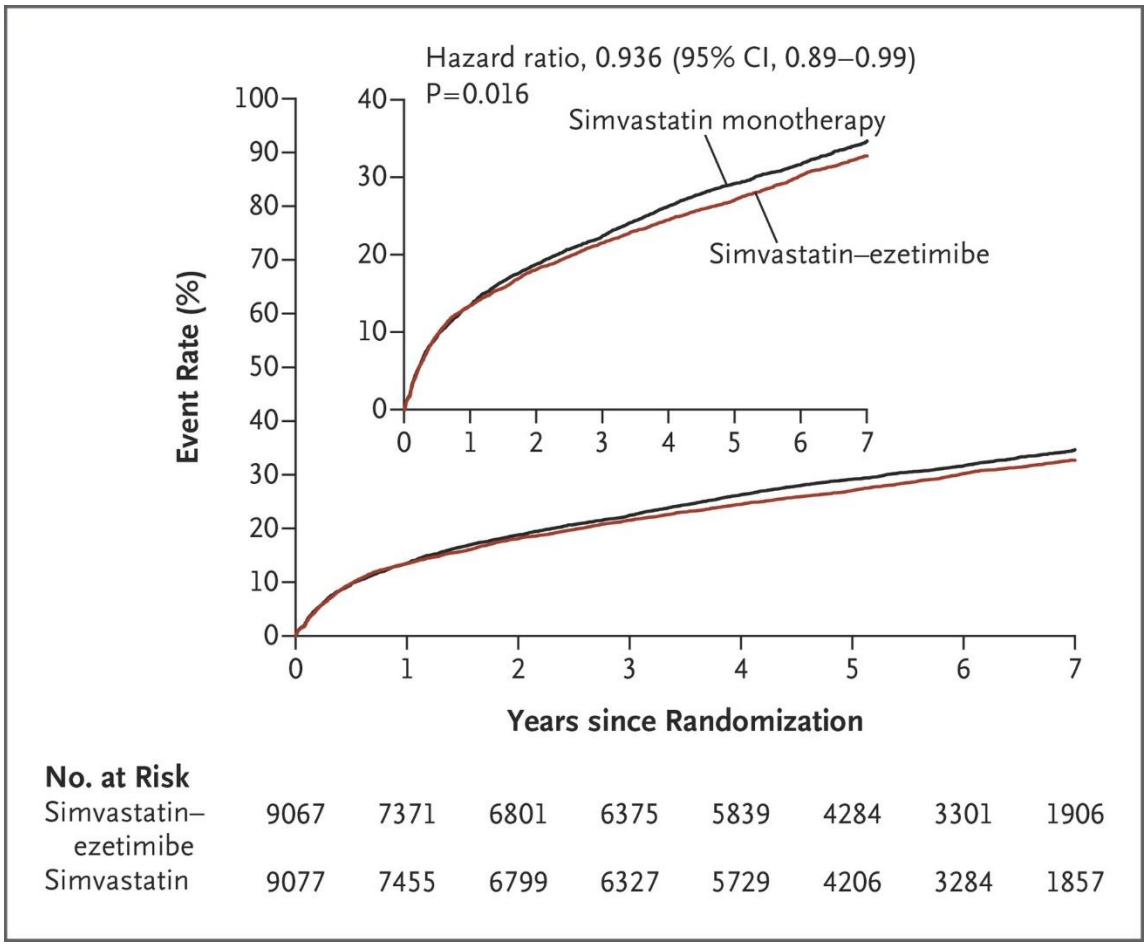


Figure 15 : Efficacité de la supplémentation du traitement statine avec ézétimibe sur les évènements cardiovasculaires (extraite de Cannon et al., 2015). La supplémentation en ézétimibe du traitement des patients sous simvastatine induit une diminution supplémentaire de 2% le risque d'évènements cardiovasculaires.

Les statines et l'ézétimibe sont les traitements de première et deuxième intention dans le cadre des maladies cardiovasculaires. Lorsque ces traitements ne permettent pas d'atteindre les valeurs seuils de LDL-C, d'autres traitements peuvent être envisagés comme l'aphérèse ou plus récemment les inhibiteurs de PCSK9.

II. Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9

1. La découverte de PCSK9

L'hypercholestérolémie familiale (FH) est une maladie génétique à transmission autosomique dominante caractérisée par des concentrations en LDL-cholestérol élevées dans le plasma et la survenue d'événements cardiovasculaires prématurés. Jusqu'en 2003, les seuls gènes connus pour être causativement impliqués dans l'hypercholestérolémie familiale étaient les gènes *LDLR* (*FH1* localisé sur le chromosome 19) dans environs 90% des cas et *APOB* (*FH2* localisé sur le chromosome 2) dans un peu moins de 5% des cas (Brown and Goldstein 1974, Innerarity 1987). Il restait donc des patients FH pour lesquels aucune mutation sur le gène du *LDLR* ni sur celui de l'*APOB* n'avait été trouvée. En investiguant une grande famille française (6 patients FH et 25 apparentés normolipémiques), l'équipe du Pr. Catherine Boileau a exclu toute association possible entre leur phénotype et les gènes *LDLR* et *APOB*. L'absence d'anomalie du LDLR a été confirmée par une série de tests de fonctionnalité sur les fibroblastes dermiques de ces patients. Leurs cellules présentaient des capacités de liaison, d'internalisation et de dégradation des LDL identiques à celles des témoins sains (Varret et al., 1999). Dans cette étude, un déséquilibre de liaison significatif a été mis en évidence entre la présence du phénotype FH et deux marqueurs microsatellites adjacents situés sur le chromosome 1 (1p34.1-p32), constituant un intervalle de 9cM pour ce troisième locus (*FH3*) après ceux du *LDLR* et de l'*APOB*.

Le locus *FH3* contient 41 gènes dont le gène *PCSK9* en position 1p32.3 qui code pour PCSK9, initialement appelée NARC-1 (Neural apoptosis regulated convertase 1). L'ADN complémentaire de *PCSK9* contient 3 617 paires de bases et code pour une protéine de 692 acides aminés. Il s'agit du neuvième membre d'une famille de protéines originales, les proprotéines convertases, des enzymes sécrétées et ayant pour fonction de générer toute une

série de peptides bioactifs parmi lesquels des hormones peptidiques comme l'insuline et le glucagon (Seidah et al., 2003).

Le séquençage des 12 exons de *PCSK9* des membres de la première famille ainsi que d'une autre famille française comprenant plusieurs individus FH pour lesquels aucune mutation du *LDLR* et de l'*APOB* n'avait été trouvée par l'équipe du Pr. Boileau, a permis d'identifier une substitution de la thymine en adénine sur l'exon 2 en position 625 chez les seuls individus FH de ces deux familles (Varret et al., 1999; Abifadel et al., 2003). Cette mutation se traduit par une substitution de la sérine, un résidu hautement conservé, par une arginine au codon 127 (S127R). De la même manière, le séquençage des 12 exons de *PCSK9* dans une troisième famille *FH3* a permis d'identifier une deuxième mutation sur l'exon 4 de PCSK9 associée au phénotype FH (**Figure 16**). Il s'agit d'une substitution de la thymine par une cytosine en position 890 qui se traduit au niveau protéique par une substitution de la phénylalanine par une leucine au codon 216 (F216L). Aucune de ces deux mutations n'a été retrouvée chez 100 individus normolipémiques (Abifadel et al., 2003). De très nombreux autres mutants de PCSK9 causativement associés au phénotype FH dans d'autres familles, comme la mutation faux-sens D374Y (l'acide aspartique en position 374 est remplacé par une tyrosine), ont depuis été découverts (Timms et al., 2004; Dron and Hegele, 2017). Il n'en reste pas moins que le clonage de PCSK9 par l'équipe du Pr. Seidah et la démonstration par l'équipe du Pr. Boileau d'une association entre la présence de mutations sur *PCSK9* et le phénotype FH dans trois familles françaises FH3 sont à l'origine de la découverte d'un nouvel acteur majeur du métabolisme des lipoprotéines et du cholestérol : PCSK9 (Lambert et al., 2012).

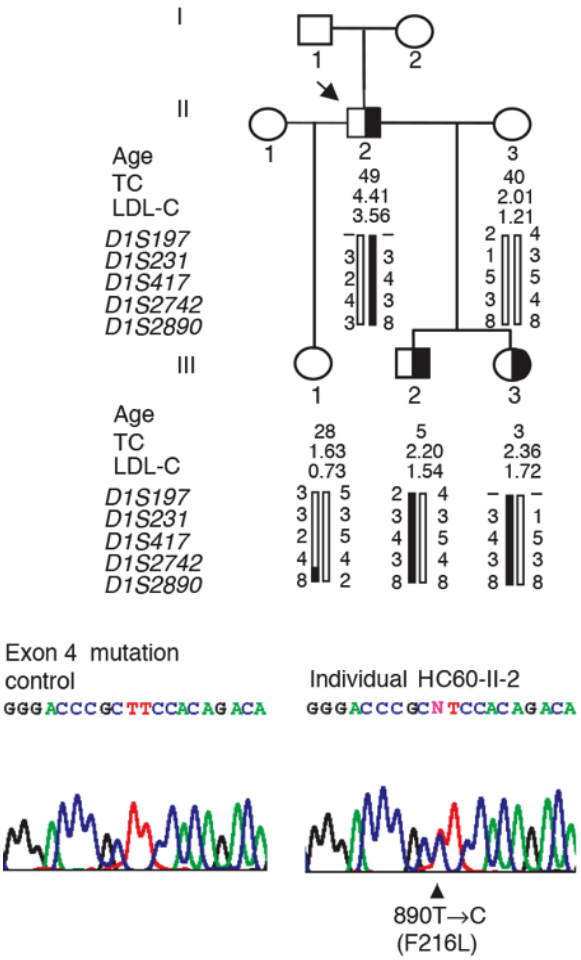


Figure 16 : Analyse génétique et détection des mutations dans une des deux familles françaises hypercholestérolémiques (extraite de Abifadel et al., 2003). L'analyse de séquence dans la 2e famille a permis l'identification de la substitution de la thymine par une cytosine en position 890 donnant la forme F216L de PCSK9.

2. La génétique de PCSK9

Les mutations du *LDLR* qui réduisent l'épuration plasmatique des LDL ainsi que les mutations de l'*APOB* dites "ligand binding defective" qui altèrent l'affinité des particules de LDL pour le LDLR provoquent l'accumulation plasmatique de LDL caractéristique du phénotype FH. En revanche, on ne connait pas en 2003 les mécanismes par lesquels des mutations faux-sens de

PCSK9, qui constituent la troisième et seule autre cause génétique connue de FH, augmentent les taux circulants de LDL.

Les premiers indices concernant le mode d'action de PCSK9 sont issus d'observations faites chez des souris auxquelles un vecteur adénoviral a été injecté au niveau hépatique leur permettant de sur-exprimer PCSK9 (Benjannet et al., 2004; Lalanne et al., 2005; Maxwell and Breslow, 2004; Park et al., 2004). La surexpression de PCSK9 a entrainé un doublement de la concentration plasmatique en cholestérol de ces animaux se traduisant par un profil lipidique similaire à celui de souris *LDLR* knockout caractérisé par une accumulation de LDL plasmatiques sans changements significatifs des taux de HDL circulants **(Figure 17)**. En revanche, la surexpression de PCSK9 n'a pas provoqué de modification substantielle du profil lipidique de souris *LDLR* knockout. Ces études ont montré une diminution drastique des niveaux d'expression protéique du LDLR sans changement significatif des niveaux d'ARNm du LDLR dans le foie des souris sur-exprimant PCSK9, ainsi qu'une diminution du catabolisme des LDL plasmatiques (Maxwell and Breslow, 2004; Park et al., 2004; Lalanne et al., 2005). A l'inverse, l'atténuation de l'expression de *PCSK9* par ARN interférence dans une lignée cellulaire hépatique humaine a augmenté les niveaux d'expression protéique du LDLR (Lalanne et al., 2005). La génération de souris PCSK9 knockout en 2005 a permis d'établir que l'absence totale de PCSK9 provoque une diminution de 53% des taux de cholestérol plasmatique, triple l'expression protéique du LDLR au niveau du foie, et augmente le catabolisme des LDL plasmatiques (Rashid et al., 2005).

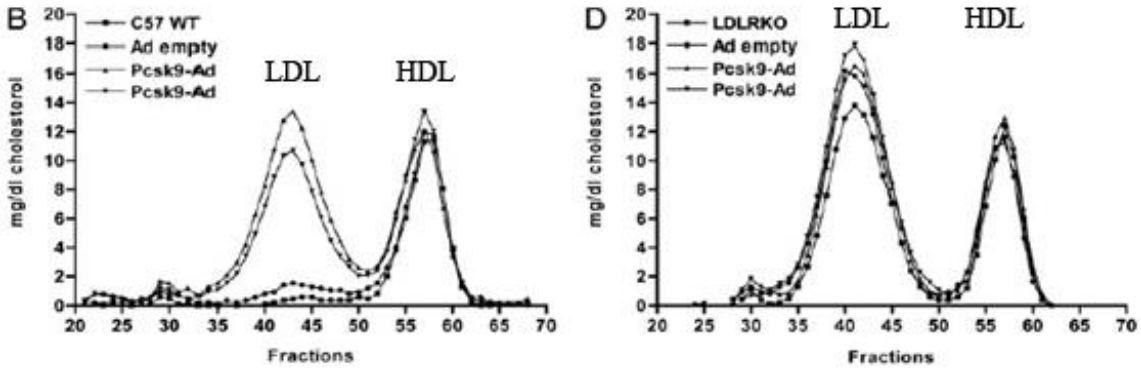


Figure 17 : La surexpression de PCSK9 entraine une augmentation du LDL-C de façon LDLR dépendante (extraite de Maxwell and Breslow, 2004). La surexpression de PCSK9 chez des souris au moyen d'adénovirus conduit à un profil lipidique similaire à celui des souris LDLR knockout.

On pouvait donc supposer que les mutations de *PCSK9* initialement associées au phénotype FH étaient des mutations "gain de fonction" (GOF) puisque la surexpression de *PCSK9* se traduisait aussi par une augmentation des taux de LDL circulants (Cohen et al., 2005). Le phénotype des souris *PCSK9* knockout suggérait *a contrario* que des mutations "perte de fonction" (LOF) de PCSK9 puissent exister et être à l'origine d'hypocholestérolémies génétiques, comme cela a été décrit pour plusieurs mutations de l'Apo B (Burnett et al., 2003).

Afin de tester cette possibilité, l'équipe du Pr. Helen Hobbs a séquencé la région codante de *PCSK9* chez les 128 individus qui présentaient les niveaux de LDL-cholestérol les plus bas (<58 mg/dL) de la cohorte en population générale *Dallas Heart Study* (Cohen et al., 2005). Ce séquençage a permis d'identifier 2 mutations non-sens sur *PCSK9* présentes uniquement chez quelques individus afro-américains : (i) une substitution de la cytosine 426 par une guanine qui se traduit par l'introduction d'un codon stop en position 142 (Y142X) troquant 80% de la protéine ainsi (ii) qu'une substitution de la cytosine 2037 par une adénine et se traduit par l'insertion d'un codon stop en position 679 (C679X) qui tronque la protéine de 14 acides aminés. Ils ont ensuite déterminé la fréquence de ces mutations parmi les 1769 afro-américains

de l'étude *Dallas Heart Study* et montré que la prévalence combinée de ces deux mutations était de 1.8%. Les porteurs des mutations Y142X et C679X ont en moyenne des niveaux de LDL-C de 63±23 mg/dL alors que les non-porteurs ont un LDL-C de 105±37 mg/dL, leurs concentrations plasmatiques en triglycérides et en HDL-C restant similaires (Cohen et al., 2005).

Dans une cohorte prospective d'étude de l'athérosclérose, l'*Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC), l'équipe du Pr. Hobbs a identifié 85 porteurs d'une de ces deux mutations "perte de fonction" qui présentaient des taux de LDL-C de 100±43 mg/dL alors que les 3 278 non-porteurs avaient en moyenne un taux de LDL-C de 138±42 mg/dL (Cohen et al., 2006). Parmi ces individus, tous afro-américains, aucun ne prenait de traitement hypolipémiant ou n'avait fait d'événement vasculaire à l'inclusion dans l'étude ARIC. Comme ils avaient été suivis pendant 15 ans pour la survenue d'événements cardiovasculaires, les auteurs de cette étude ont pu établir que seulement 1,2% des porteurs de ces mutations "perte de fonction" sur PCSK9 avaient fait un événement vasculaire alors que cette prévalence était de 9,7% parmi les non-porteurs (**Figure 18**). Dans cette même étude une autre mutation "perte de fonction" de PCSK9 a été identifiée. Il s'agit d'une mutation faux-sens caractérisée par une substitution de la guanine 137 par une thymine (G137T) induisant au niveau protéique l'ajout d'une leucine en position 46 à la place d'une arginine (R46L). La prévalence de la mutation R46L est de 3,2% chez les caucasiens et se traduit par une réduction des niveaux circulants de LDL-C de 15% en moyenne ainsi qu'une diminution de 47% du nombre d'événements cardiovasculaires (Cohen et al., 2006).

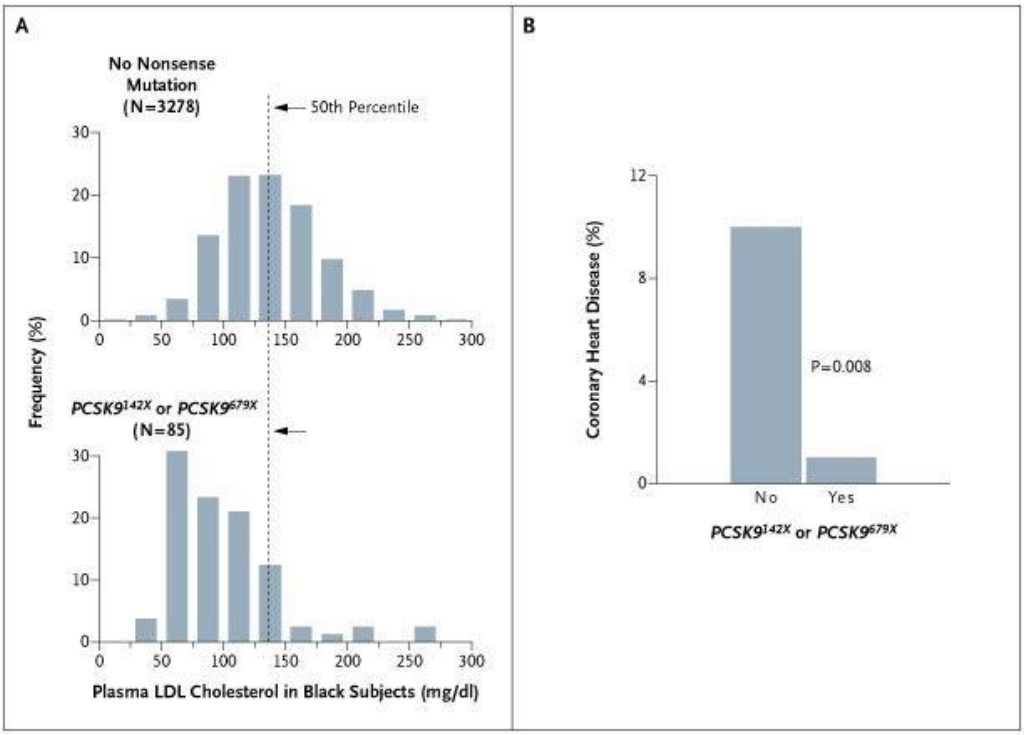


Figure 18 : Distribution des taux de cholestérol plasmatiques et incidence des maladies cardiovasculaires chez les porteurs de mutations 142X ou 679X et les individus non mutés sur PCSK9 (extraite de Cohen et al., 2006). Dans la cohorte prospective ARIC, les porteurs des mutations 142X et 679X présentaient des taux de LDL-C circulants plus bas que les non porteurs de la mutation. Parmi les porteurs des mutations LOF de PCSK9, 1,2% avaient fait un évènement cardiovasculaires. Cette prévalence était de 9,7% chez les non porteurs de la mutation.

L'ensemble de ces premières études a permis de déterminer que PCSK9 agissait comme un antagoniste de l'expression du LDLR et surtout que l'absence ou la perte de fonction de PCSK9 abaissait les niveaux circulants de LDL-C ce qui conférait aux individus porteurs une cardio-protection. Grâce à ces études, PCSK9 est passé de troisième cause génétique de l'hypercholestérolémie familiale au statut de cible thérapeutique de tout premier ordre (Lambert, 2007).

3. Expression et mode d'action de PCSK9

Trois ans après sa découverte, PCSK9 est devenu une cible thérapeutique. Cependant, les connaissances sur cette protéine restaient très limitées. Le profil d'expression et le mécanisme d'action de PCSK9 n'étaient pas élucidés.

Expression de PCSK9 - La distribution tissulaire de PCSK9 a été décrite initialement par l'équipe du Pr. Nabil Seidah (Seidah et al., 2003). Ainsi, l'ARNm de *PCSK9* a été détecté par hybridation *in situ* au niveau du télencéphale, du cervelet, du foie, du rein et de l'intestin grêle d'embryons de souris. L'expression de *PCSK9* mesurée par Northern blot dans des tissus de rats adultes était abondante au niveau du foie, du duodénum, et de l'iléon. L'ARNm de *PCSK9* était aussi présent dans plusieurs lignées cellulaires d'hépatomes comme les HepG2, de cellules de Schwann, de cellules pancréatiques de rat ou de souris, de carcinomes coliques, et de cellules neuro-épithéliales (Seidah et al., 2003). Ces observations initiales ont été confirmées par RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction) dans une étude démontrant que le foie est de loin le premier lieu d'expression de *PCSK9* (**Figure 19**), suivi par l'intestin et des sites d'expression mineurs comme le rein et le cervelet (Zaid et al., 2008). D'autres études du profil d'expression de *PCSK9* dans certains tissus ont cependant souvent échoué à démontrer la localisation exacte de l'expression de PCSK9. A titre d'exemple, au niveau pancréatique, deux équipes ont mis en évidence la présence de PCSK9 dans les cellules δ des îlots de Langerhans alors qu'une autre équipe a localisé PCSK9 au niveau des cellules β pancréatiques (Langhi et al., 2009; Mbikay et al., 2010; Da Dalt et al., 2018).

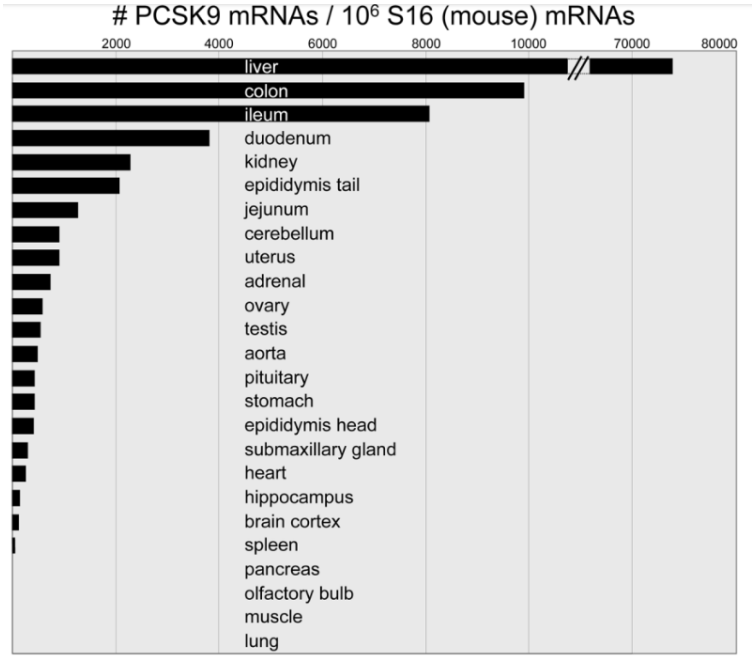


Figure 19 : Expression de l'ARNm de PCSK9 dans des tissus murins (extraite de Zaid et al., 2008). L'expression de l'ARNm de PCSK9 a été évaluée dans plusieurs tissus murins par RT-PCR. Les principaux sites d'expression sont le foie, l'intestin et le rein.

PCSK9, une protéine sécrétée - Afin d'investiguer le mode d'action de PCSK9, cette protéine a été surexprimée par transfection dans plusieurs lignées cellulaires et la diminution de l'expression du LDLR a été mesurée par western blot (Benjannet et al., 2004; Park et al., 2004; Lalanne et al., 2005; Maxwell et al., 2005; Benjannet et al., 2006; Cameron et al., 2006). L'ensemble de ces études montrent deux aspects majeurs de la biologie de PCSK9 : elle est exprimée sous la forme d'un précurseur (pro-PCSK9) de 72kDa qui subit un clivage générant la forme mature de PCSK9 (62kDa) qui est sécrétée dans le surnageant cellulaire (Park et al., 2004; Benjannet et al., 2004; Lalanne et al., 2005; Maxwell et al., 2005; Benjannet et al., 2006; Cameron et al., 2006). Par ailleurs, la réalité de la sécrétion de PCSK9 à des niveaux physiologiques a été mise en évidence par des expériences de pulse-chase dans la lignée d'hépatome HepG2 (Lagace et al., 2006). La forme mature de PCSK9 a également été détectée dans le plasma humain après immuno-précipitation (Benjannet et al., 2006). Pour vérifier si

PCSK9 fonctionne en tant que protéine sécrétée, des souris transgéniques ont été générées. Ces souris expriment PCSK9 humain sous la dépendance du promoteur de l'Apo E qui est foie spécifique. En ligne avec les études initiales, la surexpression de PCSK9 entraine une augmentation de la concentration plasmatique en LDL-C et une diminution des niveaux d'expression hépatique du LDLR chez ces souris qui présentent un profil lipidique similaire à celui des souris LDLR knockout (Benjannet et al., 2004; Maxwell and Breslow, 2004; Park et al., 2004; Lalanne et al., 2005; Lagace et al., 2006). En effectuant une élégante série d'expériences de parabioses, c'est à dire en permettant des échanges plasmatiques directs entre souris sur-exprimant PCSK9 et souris témoins, l'équipe du Pr. Horton a démontré que le plasma des souris transgéniques avait la capacité de réduire l'expression du LDLR chez les souris témoins parabiosées et d'augmenter leur cholestérolémie (Lagace et al., 2006). Cette observation a été confirmée par une étude *in vitro* montrant que le surnageant de cellules sur-exprimant PCSK9 avait la capacité de diminuer l'expression du LDLR à la surface de cellules témoins (Cameron et al., 2006). PCSK9 agit donc clairement sur l'expression du LDLR de manière endocrine. La génération de souris *PCSK9* knockout conditionnelles dont l'expression de PCSK9 a été invalidée au niveau des hépatocytes seuls a permis de montrer que le foie était la source quasi exclusive (>99%) de PCSK9 circulant *in vivo* (Lagace et al., 2006). En revanche, contrairement aux souris *PCSK9* knockout "total" qui ont une diminution de 42% du cholestérol plasmatique par rapport aux souris sauvages, les souris *PCSK9* knockout "foie" ont une cholestérolémie réduite de 27% seulement, suggérant que PCSK9 n'agit pas uniquement sous sa forme circulante et/ou que l'expression non-hépatique de PCSK9 joue un rôle non négligeable.

PCSK9 : un biomarqueur circulant ? - Etant donné que PCSK9 est une protéine sécrétée dont le rôle est de réduire de l'expression du LDLR, il a été envisagé que les niveaux circulants de PCSK9 puissent être mesurés dans le plasma humain et servent de biomarqueur de l'abondance

du LDLR à la surface des cellules des individus. Le développement de tests ELISA pour mesurer PCSK9 a été entrepris simultanément par quatre équipes de recherche. Les premiers dosages plasmatiques de PCSK9 ont donné des résultats très variables. Ainsi le dosage de PCSK9 réalisé sur 72 volontaires donne des valeurs comprises entre 50 et 600 ng/mL (Lagace et al., 2006). D'autres ont dosé PCSK9 plasmatique entre 11 et 115 ng/mL chez 55 donneurs sains, entre 420 et 13390 ng/mL dans une population de 182 individus normolipémiques et entre 100 et 9300 ng/mL dans une population de 115 patients diabétiques (Alborn et al., 2007; Mayne et al., 2007; Lambert et al., 2008). La concentration moyenne de PCSK9 plasmatique dans la population générale a été estimée à 200ng/mL (Shapiro et al., 2018). Malgré ces variations de concentrations, l'ensemble de ces études fait ressortir une corrélation positive entre PCSK9 et le LDL-C et le cholestérol total, avec des coefficients de corrélation "r" compris entre 0,15 et 0,58 selon les études (Alborn et al., 2007; Lambert et al., 2008; Chan et al., 2009; Cui et al., 2010; Dubuc et al., 2010; Welder et al., 2010; Awan et al., 2012). De même, une corrélation positive de même amplitude entre PCSK9 et le LDL-C a été montrée chez des sujets contrôles comparés à des patients hypercholestérolémiques familiaux hétérozygotes (Lambert et al., 2014). A l'inverse, une corrélation négative entre PCSK9 et le HDL-C n'est pas toujours vérifiée, certaines études la faisant ressortir et d'autres pas (Lakoski et al., 2009; Cui et al., 2010; Kappelle et al., 2011; Kwakernaak et al., 2012; Lambert et al., 2014; Chan et al., 2016). On trouve parfois une corrélation positive entre PCSK9 et triglycérides (Cui et al., 2010; Kappelle et al., 2011; Lakoski et al., 2009). L'épaisseur intima-média de la carotide, marqueur de l'athérosclérose, corrèle aussi avec PCSK9 dans plusieurs études (Chan et al., 2016; Lee et al., 2013). De plus, certaines études établissent des corrélations entre PCSK9 et des paramètres autres que les lipides comme le DT2, les indices glycémiques tels que le HOMA-IR, la glycémie à jeun et l'insulinémie à jeun (Lakoski et al., 2009; Cariou et al., 2010; Cui et al., 2010; Kappelle et al., 2011; Chan et al., 2016). Les données sur l'hémoglobine glyquées (HbA1c), biomarqueur

permettant d'estimer la glycémie des 3 derniers mois, sont quant-à-elles conflictuelles, certaines études montrant une corrélation avec PCSK9 tandis que d'autres pas (Cariou et al., 2010; Noguchi et al., 2011). Chez des patients dyslipidémiques diabétiques ou avec un métabolisme glucidique altéré, les corrélations entre PCSK9 et le LDL-C, la glycémie à jeun, l'HbA1c, l'insulinémie à jeun, et l'indice HOMA-IR sont conservées (Brouwers et al., 2011; Noguchi et al., 2011). Chez des sujets obèses, on retrouve une association entre PCSK9 et le LDL-C ainsi que les triglycérides (Kwakernaak et al., 2012). Il apparait ainsi que la mesure des taux de PCSK9 circulant soit un bon outil d'investigation en recherche. Etant donné la faiblesse des niveaux de corrélation entre PCSK9 et certains paramètres du métabolisme glucido-lipidique, au premier rang desquels on trouve le LDL-C, la mesure de PCSK9 n'est pas un outil diagnostique d'évaluation de l'activité du LDLR ni un biomarqueur de risque cardiovasculaire. Mesurer la concentration de PCSK9 dans le plasma reste donc à ce jour uniquement un instrument de recherche épidémiologique.

La Régulation de PCSK9 ou le paradoxe des statines – En 2003, l'équipe des professeurs Brown et Goldstein s'interroge sur les cibles directes des facteurs de transcription de la famille SREBPs. L'expression du LDLR est, principalement, sous la dépendance du facteur de transcription SREBP-2. Lorsque la concentration en cholestérol dans la membrane du réticulum endoplasmique diminue une série de réactions aboutit au clivage de SREBP-2 qui est alors transloqué au noyau et active l'expression de gènes cibles comme l'*HMGCR* et le *LDLR* **(Figure 13)** (Foufelle et al., 2005). Les statines inhibent l'HMG-CoA réductase lors de la synthèse endogène de cholestérol. Cette inactivation entraîne une augmentation de l'expression de SREBP-2 et donc du LDLR favorisant une diminution des taux de LDL. En utilisant des souris knockout pour *Scap* ou sur-exprimant *Srebp-2*, l'équipe des Pr. Brown et Goldstein a pu identifier au moyen de puces à ADN une expression augmentée de 505 gènes et une expression diminuée de 343 gènes dans le foie des souris *Srebp-2* et *Scap* knockout, respectivement. Parmi,

l'ensemble de ces gènes, 33 étaient surexprimés chez les souris transgéniques SREBPs et diminués chez les souris knockout *Scap*. Cette combinaison fait de ces 33 gènes des cibles directes des SREBPs. *Pcsk9* figurait parmi ces cibles identifiées (Horton et al., 2003). En parallèle, l'équipe du Pr. Breslow travaillait sur la régulation des SREBPs par une alimentation riche en cholestérol (0% vs 0,5% dans un modèle murin). De la même façon, l'utilisation de puces à ADN et de souris transgéniques a permis d'identifier un ensemble de gènes régulés par les SREBPs dont *Pcsk9* (Maxwell et al., 2003). En amplifiant la région 5' contenant le promoteur du gène de *PCSK9*, l'équipe du Pr. Wook Park a identifié la présence d'une séquence *SRE (Sterol regulatory element)* 5'-GTGGCGTGAT-3' en position -346, site auquel se fixe SREBP-2 (Dubuc et al., 2004; Jeong et al., 2008). La séquence est identique à la séquence *SRE* retrouvée dans le promoteur du *LDLR* (Costet et al., 2006; Jeong et al., 2008). Sur gel retard, la forme nucléaire de SREBP-2 est capable de se fixer spécifiquement sur la séquence *SRE* du promoteur de *PCSK9*. En analysant le profil d'expression des gènes murins après un régime riche ou non en cholestérol, il s'avère que l'expression de *Pcsk9* est contrôlée majoritairement par *Srebp-2* dans le foie (Jeong et al., 2008).

Dans l'étude du promoteur de *PCSK9*, un site de liaison au facteur nucléaire Y a été identifié entre la position -613 et le site d'initiation de la transcription (Dubuc et al., 2004). La délétion de 41 paires de bases entre -392 et -352 entraîne une perte d'effet de la berberine sur l'expression du promoteur de *PCSK9* (Li et al., 2009). La berberine est un composé naturel connu pour augmenter l'expression du LDLR et faire diminuer les taux de LDL-C. Elle inhibe également l'expression de PCSK9 au niveau ARNm et protéique *in vitro* (Koppen et al., 2017; Li et al., 2009). L'analyse de cette séquence identifie un site de liaison du facteur de transcription *HNF1a* entre -386 et -374 sur le promoteur de *PCSK9*. La mutation de ce site diminue l'effet de la berberine de 73% (Li et al., 2009). HNF1α est un facteur de transcription que l'on retrouve principalement au niveau hépatique. Il est connu pour réguler plusieurs gènes

dans le foie et le pancréas. HNF1α régulerait au moins 222 et 106 gènes cibles au niveau hépatique et pancréatique, respectivement (Odom et al., 2004). L'ensemble de ces résultats montrent, qu'en plus de SREBP-2, HNF1α est un régulateur majeur de l'expression génique de *PCSK9* (Dong et al., 2010).

En 2004, une autre étude révèle qu'un traitement d'hépatocytes avec 10µM d'atorvastatine entraîne une augmentation de l'expression de *PCSK9* d'un facteur 11 comparé à la condition contrôle tandis que l'expression du LDLR n'augmente que d'un facteur 6. Cet effet est contrecarré par le produit de la réaction enzymatique catalysée par l'HMG-CoA réductase, le mévalonate **(Figure 20)** (Dubuc et al., 2004). De plus, l'inactivation de *Pcsk9*, chez des souris, entraîne une diminution des taux de cholestérol circulant et les rend plus sensibles aux statines (Rashid et al., 2005). Chez 9 sujets présentant des mutations LOF sur le gène de *PCSK9* (R46L, G106R, R237W et N157K), la réponse aux statines est également augmentée (Berge et al., 2006). A l'inverse, les sujets porteurs de la mutation GOF D374Y semblent résistants aux statines (Naoumova Rossi P. et al., 2005).

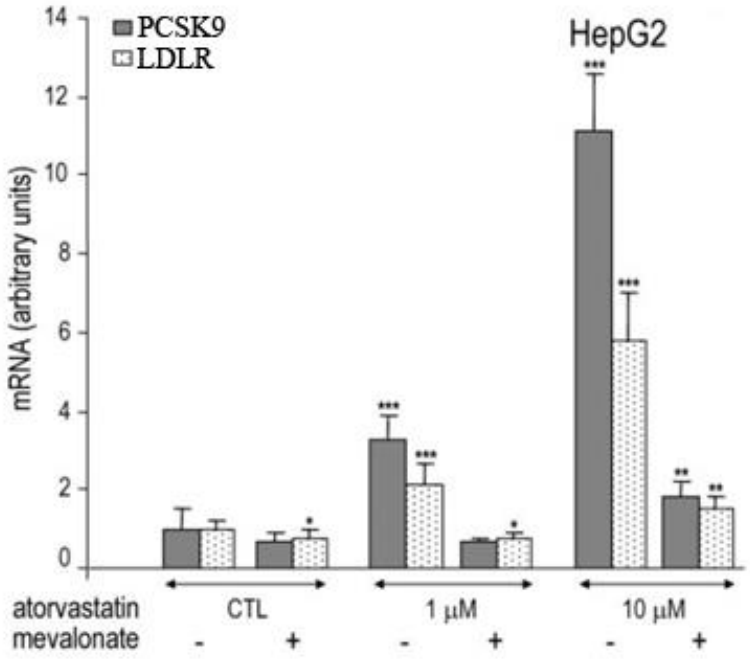


Figure 20 : L'expression de PCSK9 par des hépatocytes HepG2 est augmentée après un traitement à l'atorvastatine (extraite de Dubuc et al., 2004). Le traitement d'hépatocytes avec 10µM d'atorvastatine entraîne une augmentation de l'expression de PCSK9 d'un facteur 11 comparé à la condition contrôle tandis que l'expression du LDLR n'augmente que d'un facteur 6. L'ajout de mévalonate abolit l'effet de la statine.

Au niveau clinique, après 16 semaines de traitement à 10 mg/jour d'atorvastatine, les taux plasmatiques en LDL-C de patients (n=7) diminuent de 30% et les taux de PCSK9 restent inchangés. On pourrait penser que l'augmentation de la dose de statine favoriserait une diminution plus importante des taux de LDL-C. Cependant, un traitement à 40 mg/jour d'atorvastatine n'induit une diminution supplémentaire des taux de LDL-C plasmatique que de 12%, soit 42% au total (n=12). En revanche, la concentration de PCSK9 circulant augmente de 34% (Careskey et al., 2008). Plusieurs analyses de cohortes montrent une augmentation de PCSK9 après traitement avec une statine **(Tableau 3)** (Nozue, 2017). Une étude rapporte que l'utilisation de statine à forte dose fait perdre la corrélation entre PCSK9 et LDL-C (Welder et al., 2010).

Effect of statins on circulating PCSK9 levels

Types of statin	Dose (mg/day)	Duration of treatment	% change in PCSK9	Author (reference)
Atorvastatin	10	1 day	13%	Guo (39)
	10	1 day	24%	Costet (38)
	10	4 weeks	5.70%	Guo (39)
	10	6 weeks	7.40%	Mayne (37)
	10	6 weeks	14%	Costet (38)
	10	8 weeks	7.20%	Guo (39)
	10	16 weeks	19%	Khera (40)
	20	4 weeks	30%	Guo (39)
	20	8 weeks	35%	Guo (39)
	20	8 weeks	39%	Guo (98)
	40	12 weeks	38%	Tremblay (99)
	40	16 weeks	34%	Careskey (15)
	80	1 day	27%	Guo (39)
	80	4 weeks	37%	Raal (42)
	80	16 weeks	27%	Khera (40)
	80	16 weeks	47%	Welder (33)
Simvastatin	10	6 weeks	no change	Lakoski (21)
	20	16 weeks	13%	Khera (40)
	40	14 days	68%	Berthold (41)
	80	16 weeks	41%	Khera (40)
Rosuvastatin	20	1 year	28–35%	Awan (22)
	40	4 weeks	37%	Raal (42)
Pitavastatin	4	8 months	31%	Nozue (43)
Pravastatin	20	8 months	34%	Nozue (43)

PCSK9; proprotein convertase subtilisin/kexin type 9.

Tableau 3 : Effet des statines sur les niveaux circulants de PCSK9 (extrait de Nozue, 2017). Les statines induisent une augmentation de la sécrétion de PCSK9 décrite dans plusieurs études.

Les statines entraînent la surexpression du LDLR en activant SREBP-2 ; c'est ce qui entraîne la diminution des taux de LDL-C. Il s'avère que PCSK9 est également sous le contrôle de ce même facteur de transcription. Ainsi, les statines augmentent l'expression du LDLR mais aussi celle de PCSK9, son inhibiteur **(Figure 21)** (Sahebkar et al., 2015). Il en résulte au niveau

thérapeutique que l'augmentation de la dose de statine n'est pas proportionnelle à la diminution des taux de LDL-C. Cette diminution est amoindrie par PCSK9. C'est le paradoxe des statines.

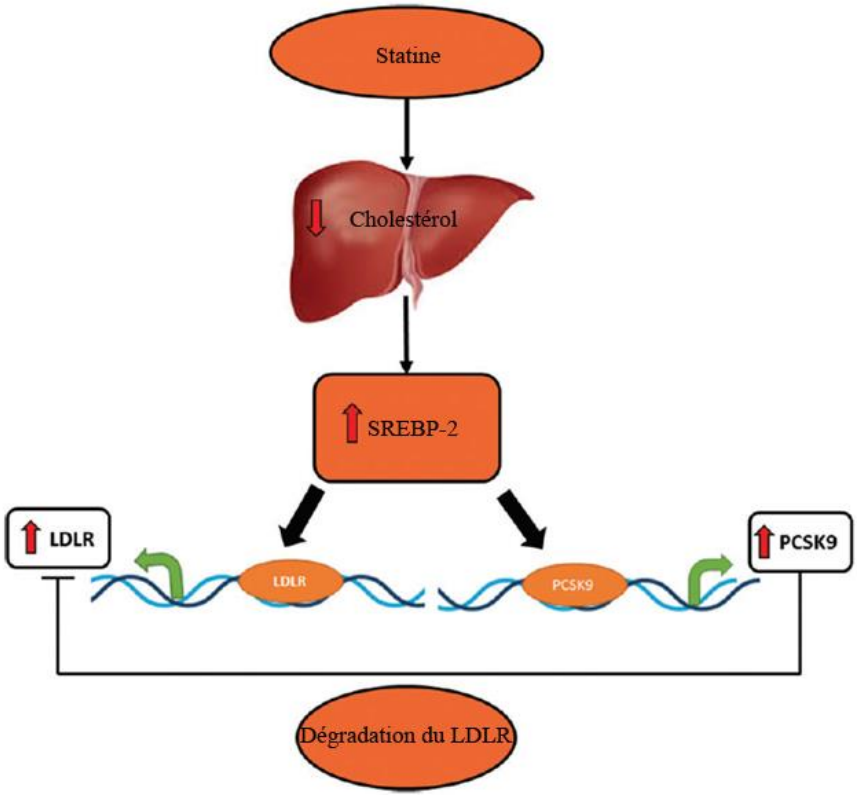


Figure 21 : Le paradoxe des statines (extraite et traduite de Sahebkar et al., 2015). Les statines entraînent la surexpression du LDLR en activant SREBP-2. PCSK9 est également sous le contrôle de SREBP-2. Ainsi, les statines augmentent l'expression du LDLR mais aussi celle de PCSK9, son inhibiteur. L'augmentation de la dose de statine n'est pas proportionnelle à la diminution des taux de LDL-C à cause de PCSK9.

La biologie de PCSK9 – Les premiers indices de l'activité physiologique de PCSK9 viennent des mutations « gain de fonction » de PCSK9 causant l'hypercholestérolémie familiale (Abifadel et al., 2003). Par la suite, des études ont montré que la surexpression de PCSK9 réduit l'abondance du LDLR au niveau des hépatocytes (Lalanne et al., 2005; Maxwell et al., 2005; Park et al., 2004). A l'inverse, les individus porteurs de mutation non-sens ou faux sens de PCSK9 présentent des taux plasmatiques de LDL-C bas (Cohen et al., 2005, 2006). Ces données

génétiques indiquent clairement que la fonction de PCSK9 est de réguler négativement l'abondance du LDLR.

PCSK9 est une protéase à sérine de 692 acides aminés synthétisée au niveau du RE sous la forme d'un précurseur pro-PCSK9 de 72kDa. La proprotéine est composée d'un peptide signal (résidus 1-30), d'un prodomaine (résidus 31-152), d'un domaine catalytique comprenant la triade catalytique N186 H226 et S386 (résidus 153-451) et d'un domaine C-terminal (452-692) (Blanchard et al., 2018; Lambert et al., 2012). Lors de sa synthèse, pro-PCSK9 subit un clivage intramoléculaire autocalytique entre les résidus glutamine 152 et sérine 153 dans le réticulum endoplasmique pour former PCSK9 mature de 62kDa (Li et al., 2007; McNutt et al., 2007). Le prosegment clivé agit comme un inhibiteur du domaine catalytique et comme une chaperonne assurant le bon repliement et la sortie du RE de PCSK9 mature. Après clivage, le prodomaine forme des liaisons hydrogènes avec le domaine catalytique qui ne subit pas de second clivage comme pour les autres convertases. L'encombrement stérique du domaine catalytique de PCSK9 empêche toute autre réaction enzymatique avec de potentiels substrats. La capacité de PCSK9 à dégrader le LDLR est donc indépendante de l'activité catalytique (Poirier and Mayer, 2013).

En 2006, le mécanisme par lequel PCSK9 dégrade le LDLR n'est pas connu. Les prémices du mode d'action de PCSK9 seront établis par l'équipe du Pr. Horton (Lagace et al., 2006). Après avoir démontré, *in vitro*, que l'ajout de PCSK9 exogène sur des hépatocytes réduit l'expression du LDLR, cette équipe a souhaité déterminer si l'association de PCSK9 ou son internalisation est dépendante du LDLR. Pour cela, ils ont utilisé des fibroblastes d'embryon de souris (MEFs). L'ajout de PCSK9 sur des MEFs dérivés de souris sauvages ou *Ldlr* knockout montre que PCSK9 est capable de s'associer avec les MEFs sauvages mais pas avec les MEFs *Ldlr* knockout **(Figure 22)**. Des observations microscopiques ont permis de mettre en évidence que PCSK9 est internalisé avec le LDLR et dirigé vers les endosomes/lysosomes (Lagace et al.,

2006). Au niveau hépatique, il est connu que l'endocytose du LDLR nécessite une protéine adaptatrice LDLRAP1 (LDLR adaptor protein) qui lorsqu'elle est mutée cause l'hypercholestérolémie familiale autosomique récessive (ARH) (Garcia et al., 2001). Cette protéine se lie au domaine intracellulaire du LDLR et à la clathrine. Cette même équipe a montré au moyen d'hépatocytes primaires murins knockout pour *le Ldlrap1* que l'internalisation mais pas l'association de PCSK9 au LDLR est dépendante de LDLRAP1 (Lagace et al., 2006). En 2007, l'équipe du Pr. Hobbs montre par une série de délétions de domaines conservés sur le LDLR que PCSK9 s'associe au LDLR au niveau du domaine EGF-A (Zhang et al., 2007). Les mécanismes précis de l'internalisation du complexe PCSK9-LDLR ne sont pas totalement élucidés à ce jour. Une étude suggère que la présentation de PCSK9 au LDLR serait dépendante des héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) (Gustafsen et al., 2017). En 2019, l'équipe du Pr. Kim a proposé un nouveau mécanisme d'internalisation du complexe PCSK9-LDLR. En absence de PCSK9, le LDLR et la particule de LDL rentrent dans la cellule par endocytose dépendante de la clathrine. Lorsque PCSK9 est présent, celui-ci interagirait avec CAP1 (cyclase-associated protein 1) et orienterait le complexe vers une endocytose dépendante de la cavéoline (Jang et al., 2020).

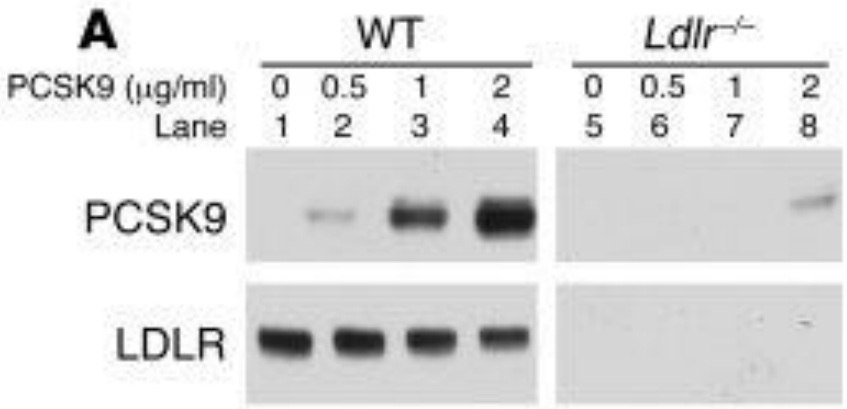


Figure 22 : L'endocytose de PCSK9 est dépendante du LDLR (extraite et adapté de Lagace et al., 2006). PCSK9 est retrouvé de façon dose dépendante dans les extraits cellulaires de MEFs dérivés de souris sauvages mais pas dans les extraits cellulaires de MEFS Ldlr knockout.

Deux voies de dégradations du LDLR médiées par PCSK9 ont été décrites : la voie extracellulaire qui semble majoritaire et la voie intracellulaire. Au niveau extracellulaire, à la membrane plasmique (à pH neutre), le domaine catalytique de PCSK9 interagit avec le domaine EGF-A du LDLR. Après endocytose, le pH acide de la vésicule favorise une augmentation de l'affinité de PCSK9 pour le LDLR (Fisher et al., 2007). Le prodomaine de PCSK9 établit quant à lui des liaisons salines avec le LDLR et le bloque dans une conformation « ouverte ». Le recyclage et le retour à la membrane du LDLR nécessite une conformation « fermée » au niveau de l'endosome. PCSK9 empêche le récepteur de retrouver une conformation « fermée » et l'oriente donc vers une dégradation lysosomale **(Figure 23)** (Fisher et al., 2007). Au niveau intracellulaire, PCSK9 peut interagir avec le LDLR lors de sa synthèse dans le RE puis dans l'appareil de Golgi et le diriger comme précédemment vers une dégradation lysosomale. GRP94, une protéine résidente du RE inhibe la dégradation intracellulaire du LDLR induite par PCSK9 en permettant la ségrégation de PCSK9 et du LDLR néo-synthétisés dans le RE **(Figure 23)** (Poirier et al., 2015).

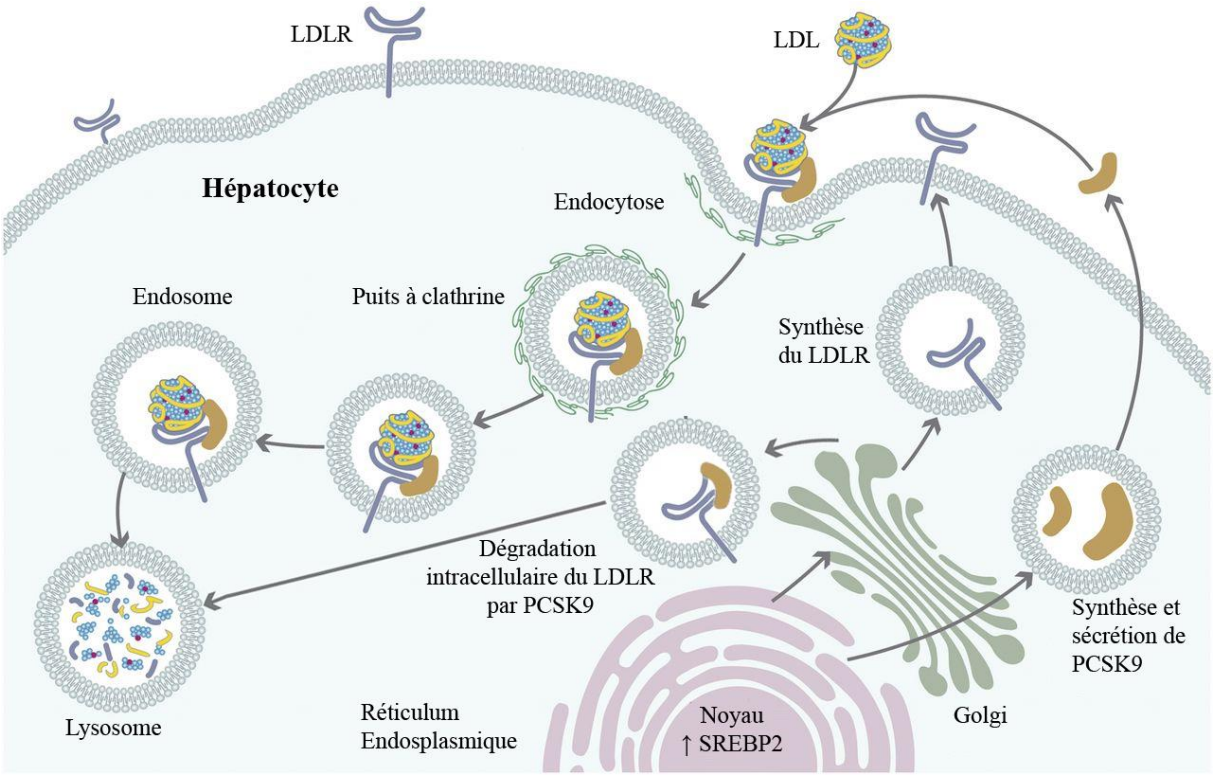


Figure 23 : Mécanisme de dégradation du LDLR par PCSK9 (extraite et adaptée de Lambert et al., 2012). Après sa sécrétion, le domaine catalytique de PCSK9 interagit avec le domaine EGF-A du LDLR induisant l'endocytose du complexe. Le pH acide de la vésicule favorise une augmentation de l'affinité de PCSK9 pour le LDLR. Le prodomaine de PCSK9 établit quant à lui des liaisons salines avec le LDLR et le bloque dans une conformation « ouverte ». Le recyclage et le retour à la membrane du LDLR nécessite une conformation « fermée » au niveau de l'endosome. PCSK9 empêche le récepteur de retrouver une conformation « fermée » et l'oriente vers une dégradation lysosomale. PCSK9 peut interagir avec le LDLR lors de sa synthèse dans le RE puis dans l'appareil de Golgi et le diriger comme précédemment vers une dégradation lysosomale.

Ainsi, PCSK9 est un inhibiteur circulant et naturel du LDLR. Il empêche son recyclage à la membrane et l'oriente vers une dégradation endolysosomale. Il existe un autre inhibiteur naturel du LDLR, l'E3 ubiquitine ligase IDOL (Inducible Degrader Of the Low density lipoprotein receptor) qui agit spécifiquement au niveau intracellulaire (Zelcer et al., 2009; Zhang et al., 2012a).

4. Les inhibiteurs de PCSK9

PCSK9 est une protéine sécrétée qui empêche le recyclage à la membrane du LDLR (Lagace et al., 2006). Les mutations sur PCSK9 peuvent être à l'origine d'hypercholestérolémie, et donc de maladies cardiovasculaires, ou d'hypocholestérolémie. Le traitement le plus efficace dans le cadre des maladies cardiovasculaires est la prescription de statines (Dadu and Ballantyne, 2014). Néanmoins, dans certains cas l'action de ces hypocholestérolémiants est limitée chez certains individus intolérants aux statines ou à cause du « paradoxe des statines » (Cannon et al., 2004; Avis et al., 2010). Ces observations ont fait de PCSK9 une cible thérapeutique d'intérêt majeur concernant la réduction des taux de LDL-C circulants. Plusieurs stratégies

d'inhibition de PCSK9 ont été mises en place. Parmi celles-ci, on peut distinguer les « gene-silencer », les petites molécules inhibitrices comme les peptides mimétiques ou les adnectines, les vaccins et les anticorps monoclonaux (Dadu and Ballantyne, 2014; Lambert et al., 2012).

Gene-silencing par oligonucléotides anti-sens – Dans une première étude dirigée par le Pr. Horton, des souris déficientes pour le gène *Pcsk9* ont été générées. La délétion de la moitié de l'exon 2 jusqu'à l'exon 4 du gène a provoqué une augmentation d'un facteur 2,8 des taux protéiques de LDLR favorisant une clairance des lipoprotéines à Apo B cinq fois plus efficace comparée aux souris sauvages (Rashid et al., 2005). En lien avec cette étude et les données épidémiologiques, les premières stratégies visant à inhiber PCSK9 ciblaient sa synthèse. La compagnie Isis Pharmaceuticals a mis au point des oligonucléotides anti-sens (ASO). Il s'agit de petites séquences nucléotidiques complémentaires de l'ARN messager de PCSK9 qui empêchent la traduction de la protéine et donc sa synthèse. Deux injections par semaine du plus efficace d'entre eux à des souris hyperlipémiques a atténué l'expression de l'ARNm de *Pcsk9* de 92%. Cette réduction a été accompagnée d'un doublement de l'abondance du LDLR et d'une diminution de 33% des taux de LDL (Graham et al., 2007). Des résultats similaires ont été observés sur des lignées d'hépatocytes humains et des souris avec un ASO de Santaris Pharma. Son administration a provoqué une baisse de 60% de l'expression de l'ARNm de *Pcsk9* et une hausse des taux protéiques du LDLR de 2,5 à 3 fois (Gupta et al., 2010). L'injection des ASOs de Santaris Pharma à des singes a engendré une diminution de 85% de l'expression de l'ARNm de *PCSK9* qui se traduit par une décroissance de 50% des taux de LDL (Lindholm et al., 2012). Ces résultats prometteurs ont permis à l'ASO de Santaris Pharma SPC5001 d'être testé en essai clinique de phase I. Cependant, l'essai a été terminé à cause de réaction sur le site d'injection et de toxicité rénale (van Poelgeest et al., 2015).

Gene silencing par small interfering RNA – Une autre stratégie d'inhibition de PCSK9 consiste en l'utilisation de petits ARN interférants (siRNA) administrés par voie intraveineuse

sous la forme de nanoparticules lipoïdes (LNP). Cette technologie a été développée par Alnylam Pharmaceuticals. L'incorporation du siRNA LNP-PCS dans les nanoparticules permet de cibler les hépatocytes, *in vivo*, et d'amoindrir la toxicité des particules. L'injection de la 2e génération du siRNA LNP-PCS-A2 à la dose de 5mg/kg chez des souris a permis une diminution de 60-70% de l'expression de l'ARNm de *Pcsk9* associée à une baisse de 30% du cholestérol total. Chez le rat, des tendances similaires ont été observées. Une forme modifiée du siRNA, LNP-PCS-C2, qui cible uniquement le gène *PCSK9* humain a été administrée à des souris transgéniques exprimant *PCSK9* humain. LNP-PCS-C2 a atténué de 70% l'expression de PCSK9 (Frank-Kamenetsky et al., 2008). Ces résultats donneront lieu à l'élaboration d'Inclisiran (ALN-PCSsc) par Alnylam Pharmaceuticals. Il s'agit d'un siRNA synthétique injecté en sous-cutané dirigé contre *PCSK9*. Le siRNA est conjugué à des carbohydrates N-acetylgalactosamine tri-antennaires rendant l'internalisation de ces siRNA très spécifique au niveau des hépatocytes. En effet, ces carbohydrates se lient aux récepteurs asialo-glycoprotéines exprimés majoritairement par les cellules hépatiques (Fitzgerald et al., 2017). Inclisiran est testé dans le programme d'essai clinique ORION. Lors de la phase II, 501 patients avec un LDL-C supérieur à 70mg/dL ou 100mg/dL sous dose maximale de statine ont été recrutés. De façon randomisée, certains patients ont reçu une dose d'Inclisiran au 1er jour et d'autres en ont reçu 2 doses aux 1er et 90e jours, respectivement. Le point final principal de l'étude était le pourcentage de variation en LDL-C du 1er jour au 360e jour. Il en ressort que l'injection de la dose maximale de 500mg induit une diminution de 70% de PCSK9 au bout de 14 jours. Cette injection a abouti à une réduction de 29,7% de PCSK9 au bout de 360 jours correspondant à une baisse de 21,6% du taux de LDL-C. L'injection de deux doses d'Inclisiran à la dose maximale de 300mg a induit une diminution de 65% de PCSK9 au 14e jour et une diminution de 75% au 120e jour. Il en résulte une baisse de PCSK9 finale de 37,7% après 360

jours correspondant à une réduction de 31,4% du taux de LDL-C **(Figure 24)** (Ray et al., 2019a). Les essais cliniques de phase III d'Inclisiran sont actuellement en cours.

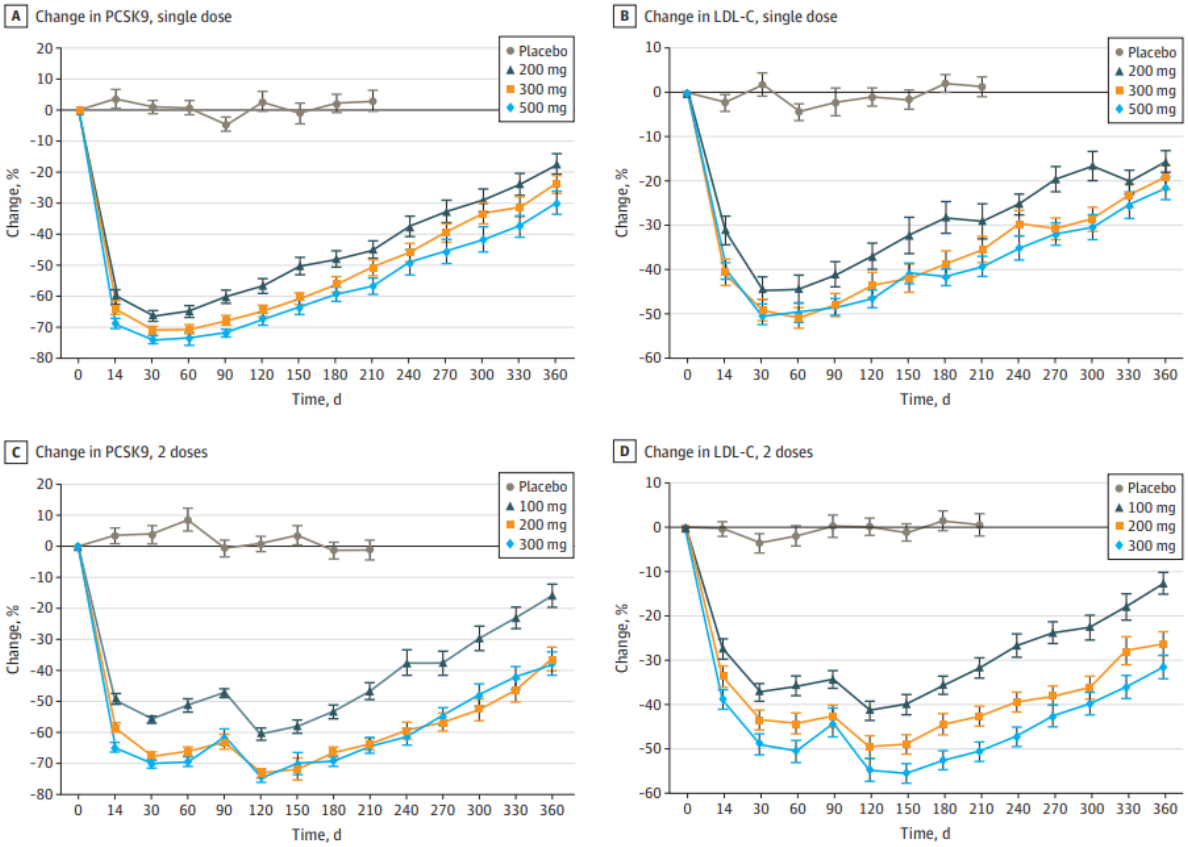


Figure 24 : Effet d'Inclisiran sur PCSK9 et le LDL-C après une ou deux injections (extraite de Ray et al., 2019a). Niveaux de PCSK9 et de LDL-C après une (A, B) ou deux injections (C, D) de dosses croissantes d'Inclisiran chez des patients sous statines. Chez des patients avec un taux de LDL-C supérieur à 70mg/dL ou 100mg/dL sous dose maximale de statine, l'injection de 500mg a induit une diminution 70% de PCSK9 au bout de 14 jours. Cette injection a abouti à une réduction de 29,7% de PCSK9 au bout de 360 jours correspondant à une baisse de 21,6% du taux de LDL-C. L'injection de deux doses d'Inclisiran à 300mg a induit une diminution de 65% de PCSK9 au 14e jour et une diminution de 75% au 120e jour. Il en résulte une baisse de PCSK9 finale de 37,7% après 360 jours correspondant à une réduction de 31,4% du taux de LDL-C.

Adnectine – Les adnectines sont des petites protéines (<12kDa) dérivées du domaine III de la fibronectine humaine. Les adnectines ont été identifiées par l'équipe du Pr. Mitchell à partir de librairie d'ARNm lors de la recherche de nouveaux inhibiteurs de PCSK9. Ces peptides ne possèdent pas de région similaire aux immunoglobulines, ni de pont disulfure et ne sont pas glycosylés. Ils sont thermiquement stables et ne forment pas de dimère en solution. Ces propriétés ont fait d'eux de potentiels agents thérapeutiques dans la stratégie d'inhibition de PCSK9. Après optimisation du peptide initial, cette équipe a obtenu le clone 1459D05 puis le clone BMS-962476. Ce dernier présentait une meilleure affinité pour le domaine catalytique de PCSK9 et empêchait sa liaison avec le LDLR (Mitchell et al., 2014). La molécule BMS-962476 a été testée dans un essai clinique de phase I sur 64 sujets sains avec un LDL-C supérieur à 130mg/dL ou sous statine avec un LDL-C supérieur à 100mg/dL. Après injection d'une dose supérieure à 0,3mg/kg en intraveineuse ou sous cutanée, PCSK9 libre a diminué de plus de 90% occasionnant une baisse maximale de 48% des taux de LDL-C entre le 4e et 14e jours (Stein et al., 2019). Une nouvelle molécule LIB003, adnectine développée à partir de BMS-962476 est actuellement en essai clinique de phase II sur 32 participants. Cette étude doit se terminer courant 2020 (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03847974).

Peptides mimétiques – Les interactions protéine-protéine sont responsables d'innombrables processus moléculaires. Les peptides mimétiques possèdent une conformation spatiale similaire à celle de certaines protéines. Ils permettent ainsi, par compétition allostérique, d'inhiber ces interactions. Une stratégie d'inhibition de la dégradation du LDLR par PCSK9 est d'empêcher leur interaction. Actuellement, les recherches portent essentiellement sur le domaine EGF-A du LDLR. En effet, la structure cristallographique du complexe PCSK9 et du domaine EGF-A a révélé des sites potentiels pour l'élaboration d'éventuels peptides mimétiques (Kwon et al., 2008). En 2008, l'équipe du Dr. Hedrick a montré pour la première fois sur des hépatocytes en culture que le peptide EGF-A était capable d'inhiber la dégradation du LDLR médiée par

PCSK9 de façon dose dépendante (Shan et al., 2008). Dans cette étude, l'incubation concomitante des HepG2 avec 30µM du peptide EGF-A et 100nM de PCSK9 a permis une restauration de l'expression du LDLR à hauteur de 30% caractérisée par une internalisation de plus de 80% des particules de LDL (Shan et al., 2008). Des optimisations et la substitution du résidu d'acide aminé asparagine 310 en lysine ont permis la synthèse d'EGF66 qui présentait une affinité 13 fois augmentée pour PCSK9. Chez des souris traitées avec 30µg de PCSK9, ce peptide a été capable de restaurer à 100% l'expression du LDLR hépatique (Zhang et al., 2012b). Une partie plus petite du peptide EGF-A a été sélectionnée et modifiée en tant que potentiel inhibiteur de PCSK9. L'équipe du Pr. Craik s'est inspirée d'un variant naturel GOF H306Y d'EGF-A pour améliorer sa liaison avec PCSK9. Le peptide EGF-A H306Y tronqué présentait un doublement d'affinité pour PCSK9. Le traitement d'hépatocytes humains avec PCSK9 et le peptide tronqué a favorisé un recyclage plus efficace du LDLR à la membrane comparé au peptide EGF-A sauvage (Schroeder et al., 2014). Récemment une étude a été réalisée en utilisant la forme GOF D374Y de PCSK9. Deux peptides analogues du domaine EGF-A ont été développés et testés sur une lignée cellulaire d'hépatomes humains. Le plus efficace des deux, le peptide tronqué, a restauré à 80% l'abondance du LDLR à la surface des cellules et à 70% sa capacité à internaliser le LDL (Valenti et al., 2020).

L'ensemble de ces peptides mimétiques est toujours en phase de développement préclinique (Lavecchia and Cerchia, 2019).

Vaccins – Parmi cette multitude d'approches innovantes, on peut distinguer l'élaboration de vaccins anti-PCSK9. Cette stratégie a été adoptée par la compagnie Affiris. Des petits peptides de 8 à 13 acides aminés ont été synthétisés. Il s'agit de peptides de structure analogue à la séquence N-terminale de PCSK9 mature humaine, responsable de l'interaction avec le LDLR. Des souris BALB/c ont reçu une série d'injections de ces peptides à 1, 2 et 4 semaines. Elles ont été immunisées et ont synthétisé des anticorps anti-PCSK9 actifs. Le titre des anticorps a

triplé à la 4e semaine et a chuté de moitié à la 54e semaine. Néanmoins, un rappel vaccinal a réamorcé une synthèse accrue d'anticorps anti-PCSK9. De ce fait, l'immunisation de souris *Ldlr*$^{+/-}$ après 3 injections à 2 semaines d'intervalle a engendré une diminution des taux de LDL-C de 50% (Galabova et al., 2014). Cette étude a permis l'élaboration de vaccins anti-PCSK9. Le vaccin AT04A ainsi généré a été injecté à des souris APOE*3Leiden.CETP qui présentent un profil lipoprotéique humain et un développement rapide de plaques d'athéromes. La vaccination de ces animaux a causé une inhibition de 50% des taux circulants de PCSK9 associée à une baisse de 53% des taux de cholestérol total (Landlinger et al., 2017). Le vaccin est actuellement en essai clinique de phase I (clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02508896).

Anticorps monoclonaux – Les stratégies d'inhibition de PCSK9 les plus avancées concernent les anticorps monoclonaux dirigés contre PCSK9. Les premiers anticorps monoclonaux anti-PCSK9 ont été étudiés en 2009 par les équipes des Pr. Hooper et Jackson (Duff et al., 2009; Chan et al., 2009). Dans la première étude, l'effet de PCSK9-D374Y sur des HepG2 en culture a été invalidé par des anticorps monoclonaux commerciaux restaurant ainsi la capacité d'internalisation du LDL par ces cellules à hauteur de 70% (Duff et al., 2009). Cette étude constitue la preuve de concept des effets de l'inhibition de PCSK9 par des anticorps. Dans la seconde étude, sponsorisée par Amgen, des anticorps monoclonaux humains synthétisés ont été testés sur des hépatocytes primaires, des souris et des singes. Ces anticorps ciblaient la séquence de PCSK9 interagissant avec le LDLR. Le traitement des hépatocytes a quasi triplé l'abondance du LDLR à la membrane plasmique. Trois jours après injection de 10mg/kg d'anticorps à des souris, le cholestérol total de ces animaux a chuté de 36%. Des résultats plus prononcés ont été observés chez les singes avec une diminution de 48% du cholestérol total 10 jours après injection (Chan et al., 2009). Les premiers résultats des essais cliniques chez l'Homme avec des anticorps dirigés contre PCSK9 ont été publiés en 2012 avec les anticorps d'Amgen et de Sanofi-Regeneron (Dias et al., 2012; McKenney et al., 2012; Roth et al., 2012; Stein et al.,

2012). Un 3e anticorps généré par Pfizer a aussi été développé (Liang et al., 2012; Ballantyne et al., 2015). L'efficacité de ces anti-PCSK9 a été évaluée seule ou en complément d'une statine sur le risque de maladie cardiovasculaire chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale ou non (Shapiro et al., 2018).

Alirocumab de Sanofi est un anticorps complètement humain produit dans des cellules de souris capables de générer des immunoglobulines humaines. Les gènes murins codant pour les régions variables des chaines lourdes et légères des immunoglobulines ont été remplacés par des gènes humains homologues (Murphy et al., 2014). Alirocumab a été testé dans les essais cliniques ODYSSEY initiés en 2012. ODYSSEY est un large programme clinique subdivisé en 25 essais incluant au total 29 300 patients dans plus de 3 000 centres de 40 pays. Les critères d'inclusions étaient d'avoir été hospitalisé pour un infarctus du myocarde ou angine instable, d'avoir le LDL-C supérieur à 70mg/dL, le non-HDL-C au moins à 100mg/dL et l'Apo B au moins à 80mg/dL. Ces essais cliniques ont permis d'évaluer les effets d'Alirocumab sur les patients atteint d'hypercholestérolémie familiale hétérozygote, sur les patients hypercholestérolémiques à haut risque cardiovasculaire et sur d'autres types de patients à risque. Le point final de l'évaluation a porté sur les décès après une maladie cardiaque, les infarctus du myocarde, les AVC et les angines (McKenney et al., 2012; Roth et al., 2012; Schwartz et al., 2018; Roth, 2019). Lors de la phase III, 75mg ou 150mg d'Alirocumab ont été injectés aux patients toutes les 2 semaines excepté pour les essais CHOICE I et II dans lesquels 300mg et 150mg ont été injectés toutes les 4 semaines (Roth, 2019). L'essai clinique le plus conséquent, LONGTERM, a comptabilisé 2 341 patients sous statines. La supplémentation de leur traitement hypolipémiant avec Alirocumab a engendré une diminution des taux de LDL-C de 61% à la 4e semaine jusqu'à 52.4% à la 78e semaine **(Figure 25)** (Robinson et al., 2015). Dans les essais cliniques incluant les patients HeFH, l'injection d'Alirocumab à 75mg ou 150mg a réduit les taux de LDL-C de 48,8% et de 55%, respectivement après 24 semaines (Kastelein et al., 2017).

Une autre étude sur 1 191 patients du même type a montré l'efficacité d'Alirocumab avec une baisse de 50% à 60% les taux de LDL-C (Defesche et al., 2017). Concernant le point final de l'évaluation, Alirocumab a eu un effet plus prononcé sur les patients avec un taux de LDL-C supérieur à 100mg/dL comparés aux patients avec un taux inférieur à 100mg/dL. De plus, l'injection d'Alirocumab a induit une diminution significative des décès liés aux maladies coronariennes, des infarctus du myocarde, des AVC et des angors **(Figure 26)** (Schwartz et al., 2018). En 2015 avant même la fin des essais cliniques, ces résultats positifs permettront à Alirocumab d'être approuvé par la FDA en tant qu'hypolipémiant sous le nom de Praluent (https://www.accessdata.fda.gov/).

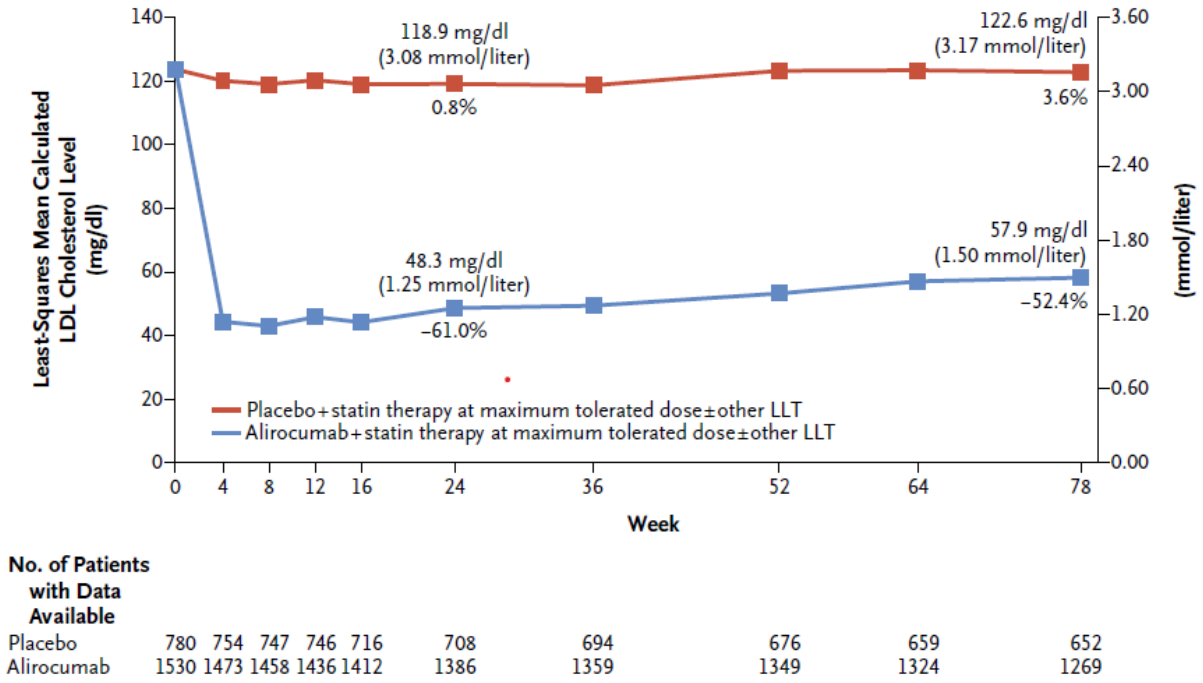


Figure 25 : Diminution des taux de LDL cholestérol après injection d'Alirocumab (extraite de Robinson et al., 2015). L'essai clinique le plus conséquent, LONGTERM, a comptabilisé 2 341 patients sous statines. La supplémentation de leur traitement hypolipémiant avec Alirocumab a engendré une diminution des taux de LDL-C de 61% à la 4e semaine jusqu'à 52.4% à la 78e semaine.

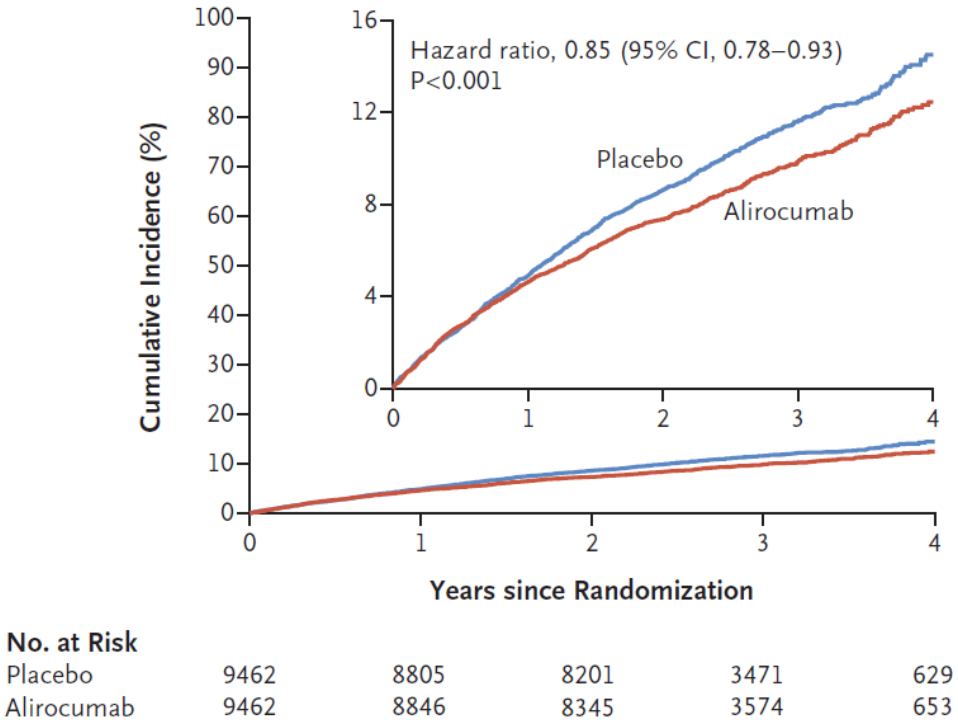
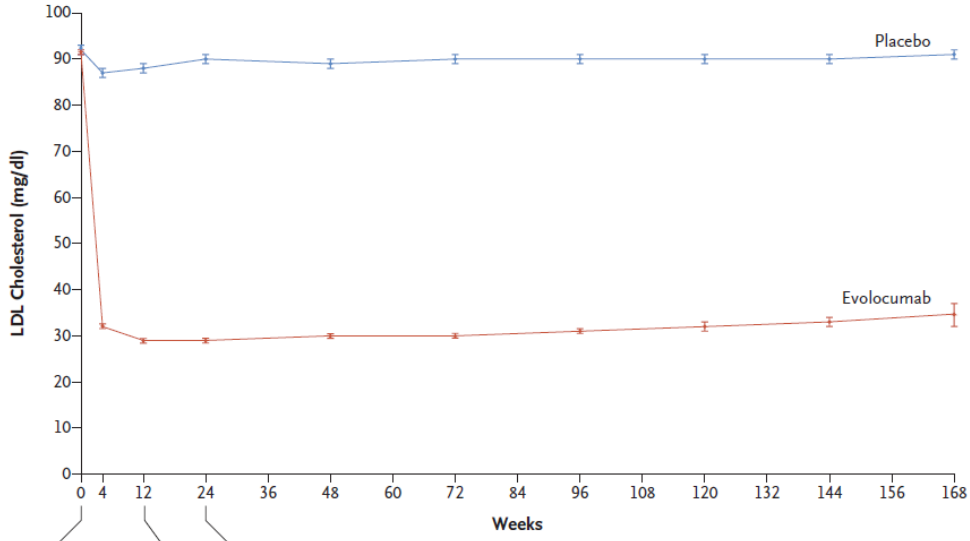


Figure 26 : Efficacité d'Alirocumab sur les points finaux de l'étude (extraite de Schwartz et al., 2018). L'injection d'Alirocumab a induit une diminution significative de 2% des décès liés aux maladies coronariennes, infarctus du myocarde, AVC et angors.

Evolocumab d'Amgen est également un anticorps complètement humanisé. Il a été testé dans le programme d'essai clinique PROFICIO (Program to reduce LDL-C and cardiovascular outcomes following inhibition of PCSK9 in different populations). Cet essai clinique est lui-même subdivisé en plusieurs essais permettant d'évaluer l'effet d'Evolocumab chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, les hypercholestérolémiques non-FH, les intolérants aux statines et à haut risque cardiovasculaire (Stein et al., 2012; Dias et al., 2012; Chapman et al., 2015). Contrairement à Alirocumab l'efficacité d'Evolocumab a également été testée chez les patients HoFH. Les 27 564 patients recrutés dans 1 242 centres de 49 pays de l'étude multicentrique FOURIER (Further cardiovascular OUtcomes Research with PCSK9 Inhibition in subjects with Elevated Risk) ont reçu soit 140mg d'Evolocumab toutes les 2 semaines soit une seule injection à 420mg tous les mois en complément d'un médicament

hypolipémiant. Pour participer à l'étude clinique, les patients devaient avoir fait un infarctus du myocarde, un AVC non-hémorragique ou une maladie vasculaire périphérique et être sous traitement hypolipémiant. Le taux de LDL-C à jeun devait être supérieur à 70mg/dL, le non HDL-C supérieur à 100mg/dL. Le point final de l'évaluation a été l'impact d'Evolocumab sur les évènements cardiovasculaires (mort cardiovasculaire, infarctus du myocarde, AVC, angine instable ou revascularisation coronarienne). L'injection d'Evolocumab a favorisé une diminution de 59% des taux de LDL-C au bout de 48 semaines correspondant en moyenne à une réduction de 56mg/dL **(Figure 27)**. Les pourcentages de la réduction des taux de LDL-C en fonction des doses injectées ne sont pas précisés dans l'étude (Sabatine et al., 2017a). En ce qui concerne le point final de l'étude, Evolocumab a réduit significativement les évènements cardiovasculaires, les infarctus du myocarde ou l'AVC **(Figure 28)** (Sabatine et al., 2017a).

Tout comme Alirocumab, Evolocumab a été approuvé par la FDA en tant qu'hypolipémiant en 2015 avant la fin des essais cliniques. Sa dénomination commerciale est Repatha (https://www.accessdata.fda.gov/).



No. at Risk										
Placebo	13,779	13,251	13,151	12,954	12,596	12,311	10,812	6926	3352	790
Evolocumab	13,784	13,288	13,144	12,964	12,645	12,359	10,902	6958	3323	768
Absolute difference (mg/dl)		54	58	57	56	55	54	52	53	50
Percentage difference		57	61	61	59	58	57	55	56	54
P value		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Figure 27 : Diminution des taux de LDL cholestérol au bout de 158 semaines après injection d'Evolocumab (extraite de Sabatine et al., 2017). L'injection d'Evolocumab a favorisé une diminution de 59% des taux de LDL-C au bout de 48 semaines correspondant en moyenne à une réduction de 56mg/dL chez des patients ayant déjà fait un évènement vasculaire majeur.

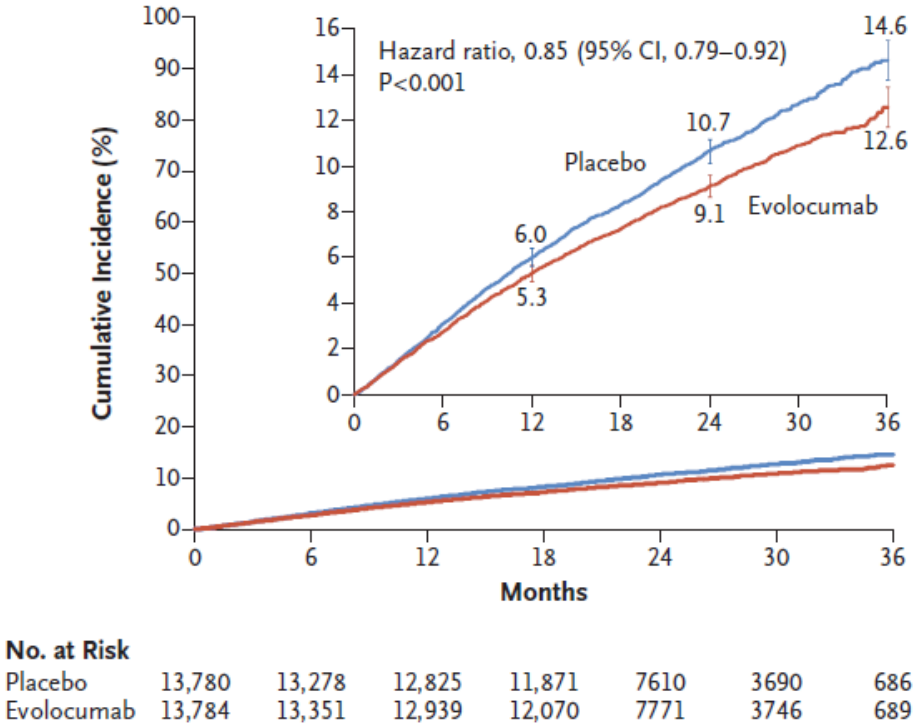


Figure 28 : Efficacité d'Evolocumab sur les points finaux de l'étude (extraite de Sabatine et al., 2017a). Evolocumab a réduit significativement les évènements cardiovasculaires, les infarctus du myocarde ou l'AVC de 2%.

Bococizumab de Pfizer est un anticorps humanisé ayant conservé environ 3% de sa séquence protéique murine dans la région du paratope. Ses effets sur la réduction des taux de LDL-C ont été évalués dans l'essai clinique SPIRE, composé de SPIRE I et SPIRE II (Studies of PCSK9 inhibition and the reduction of vascular events), initié en 2013 (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01975376;https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01975389). SPIRE a compté 27 438 patients recrutés dans 35 pays. Pour être inclus dans l'étude,

les patients devaient avoir fait un évènement cardiovasculaire, avoir un historique de diabète, de maladie rénale chronique ou de maladie vasculaire périphérique et être sous statine. Le point final de l'étude a été l'impact de Bococizumab sur les incidents cardiovasculaires, les infarctus du myocarde et les AVC non mortels, les angors nécessitant une revascularisation et la mort cardiovasculaire. Lors de la phase III, Bococizumab a été injecté à une dose de 150mg toutes les 2 semaines en sous cutanée à des patients atteints de maladies cardiovasculaires ou à haut risque pour un premier évènement vasculaire. Après 14 semaines de traitement, le taux de LDL-C des patients a chuté de 56% en moyenne **(Figure 29)**. Un traitement plus long a induit une diminution des taux de LDL-C de 41,8% après 52 semaines et de 38,3% après 104 semaines. Malgré une baisse importante et significative des taux de LDL-C, les essais sur Bococizumab ont pris fin prématurément en Novembre 2016. En effet, 10,4% des patients ont eu des irritations ou des réactions allergiques au niveau des sites d'injection. Il y a eu surtout une diminution de l'efficacité due à la nature humanisée de cet anticorps. Concernant le point final de l'étude, Bococizumab a induit une diminution des évènements vasculaires dans SPIRE II (Ballantyne et al., 2015; Ridker et al., 2017).

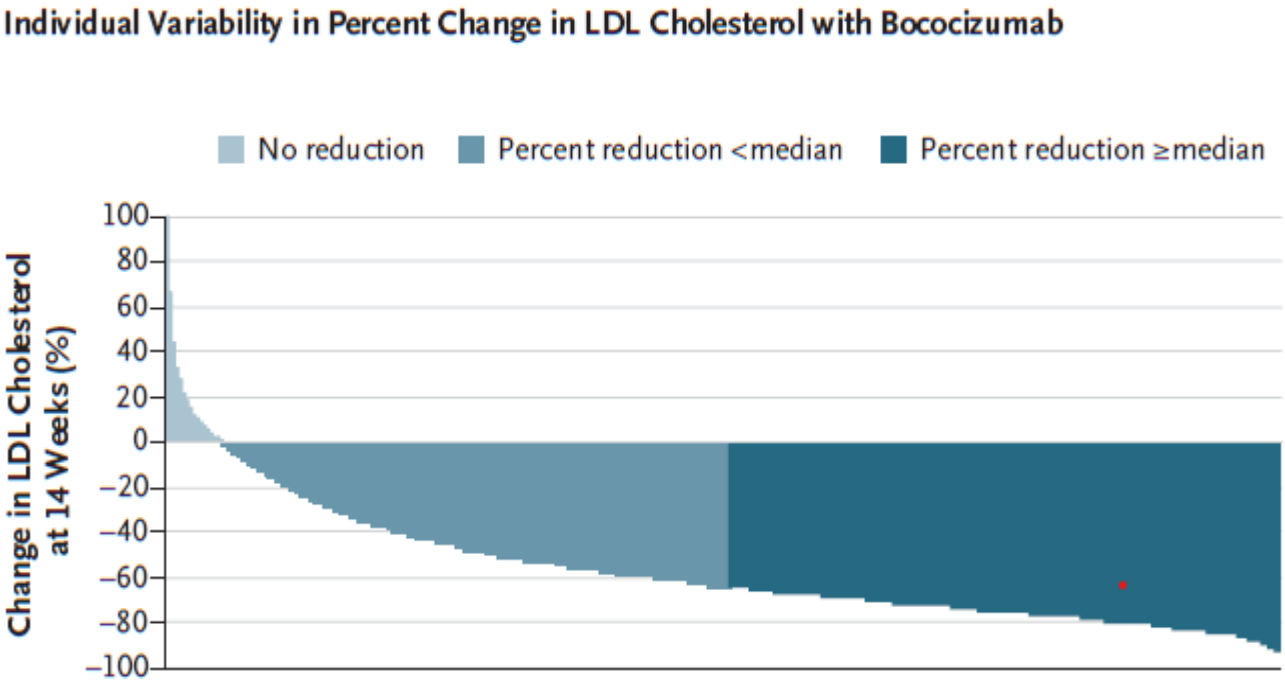


Figure 29 : Diminution des taux de LDL cholestérol au bout de 14 semaines après injection de Bococizumab (extraite de Ridker et al., 2017). Bococizumab a été injecté à une dose de 150mg toutes les 2 semaines en sous cutané à des patients atteints de maladies cardiovasculaires ou à haut risque pour un premier évènement vasculaire. Après 14 semaines de traitement, le taux de LDL-C des patients a chuté de 56% en moyenne.

Par rapport aux essais cliniques FOURIER et ODYSSEY, l'essai SPIRE II a été la plus audacieux. En effet, dans cette population les patients avaient un taux de LDL-C beaucoup plus élevé que dans les 2 autres programmes cliniques au moment de l'inclusion. Malgré l'abandon de Bococizumab, ses effets positifs sur les points finaux de l'étude ont très rapidement été observés.

Parmi la multitude de stratégies mises place pour inhiber PCSK9 seuls les anticorps monoclonaux ont obtenu à ce jour une autorisation de mise sur le marché. Le traitement d'avenir pourrait reposer sur le siRNA Inclisiran si celui-ci réussit à passer la phase III avec succès. L'efficacité de ces molécules à inhiber PCSK9 et réduire le LDL-C n'est plus à démontrer. En revanche, les effets secondaires n'ont été étudiés que sur du court terme. On ne sait pas si ces effets pourraient apparaitre en cas de traitement plus long, à l'image des statines qui sont clairement bénéfiques au niveau cardiovasculaire mais qui augmentent légèrement le risque de développer un DT2 à long terme (Lotta et al., 2016).

5. Les effets secondaires des inhibiteurs de PCSK9

Les inhibiteurs de PCSK9 sont capables de réduire le LDL-C à des taux très bas et inférieurs à ceux obtenus après traitement avec une statine seule. Le bénéfice des statines sur l'incidence des maladies cardiovasculaires est indéniable. Cependant, on peut observer chez certains patients traités à long-terme par des statines des effets secondaires sur d'autres paramètres lipidiques, sur les niveaux de vitamines liposolubles (K, A, D et E), les myalgies et

rhabdomyolyses, les déficiences neuronales (affectant la mémoire, les fonctions motrices, la démence) et le risque de développer un DT2 pour les individus prédisposés (Giugliano et al., 2017; Iqbal et al., 2019; Rosenson et al., 2018). Dans l'essai clinique JUPITER, un traitement à 20mg de rosuvastatine pendant 5 ans a augmenté le risque de développer un diabète de type 2 de 25% (Ridker et al., 2012). Par ailleurs, les mutations LOF de *PCSK9* ont été associées à une glycémie à jeun et un risque de développer un diabète augmentés (Lotta et al., 2016; Schmidt et al., 2017). Au vu des effets secondaires des statines et des études mendéliennes randomisées sur les variants de *PCSK9*, une incertitude quant-aux effets secondaires des inhibiteurs PCSK9 et en particulier sur la survenue du diabète a été soulevée.

Les effets des inhibiteurs de PCSK9 sur les autres paramètres lipidiques **–** Outre leur effet sur la réduction des taux de LDL-C, les statines font également diminuer les triglycérides. De plus, les statines les plus puissantes font augmenter les HDL (Sizar et al., 2020; Stein et al., 2001). Comme pour les statines, les effets des inhibiteurs de PCSK9 sur les autres paramètres lipidiques ont été étudiés.

Les effets d'Alirocumab sur les autres paramètres lipidiques ont été recensés dans les études FHI, FHII combinées ainsi que dans l'étude LONGTERM. L'injection d'Alirocumab à 75mg et 150mg toutes les 2 semaines a induit en moyenne une diminution de 50,2% du LDL-C dans les essais FHI, FHII et LONGTERM après 78 semaines. Les taux de triglycérides ont diminué de 9,8% et 13,2% dans ces mêmes essais cliniques. L'injection d'Alirocumab a induit une baisse de 26,9% et 26% après 78 semaines de la concentration de Lp(a) contrairement aux statines qui l'ont augmentée (Kastelein et al., 2017; Tsimikas et al., 2019). Concernant les taux de HDL-C, ils ont augmenté significativement de 7,8% et 5,9% après traitement avec Alirocumab (Kastelein et al., 2017).

Les effets d'Evolocumab sur les concentrations des lipoprotéines autres que les LDL ont été évalués dans l'essai clinique DESCARTES (Durable Effect of PCSK9 Antibody Compared

with Placebo Study). Cet essai de phase 3 a duré 52 semaines. Les 619 patients inclus ont reçu soit le placebo soit 420mg d'Evolocumab chaque mois. L'administration de l'anticorps anti-PCSK9 a induit une diminution 13% et de 9,5% les taux de VLDL-C et de triglycérides après 52 semaines (Toth et al., 2018b). La concentration plasmatique de Lp(a) a également diminué de 27,7% après injection d'Evolocumab (Blom et al., 2014). Comme pour Alirocumab, Evolocumab a permis une augmentation des taux de HDL-C de 5,7% (Toth et al., 2018b).

Bien que les études SPIRE aient été arrêtées prématurément lors de la phase III clinique, les données sur les effets secondaires à court terme ont été publiées. Bococizumab a induit une réduction du LDL-C de 50,9% à 14 semaines et de 39,5% à 52 semaines. Les triglycérides ont également diminué significativement de 13,6% et 5,9% à 14 et 52 semaines, respectivement. L'administration de Bococizumab a favorisé une baisse de 26,6% et de 21,3% à 14 et 52 semaines de la Lp(a). Les taux de HDL-C ont augmenté de 7,6% et de 8,1% après 14 et 52 semaines (Ridker et al., 2017).

Les effets des inhibiteurs de PCSK9 sur les paramètres glucidiques – L'efficacité d'Alirocumab a été testée dans un large programme d'essais cliniques ODYSSEY. Une analyse de 10 essais cliniques d'ODYSSEY a été menée par le Pr. Colhoun en 2016 afin d'évaluer l'effet d'Alirocumab sur l'incidence du prédiabète et du DT2 après 24 à 104 semaines de traitement. Cette étude a inclus 3 448 patients non diabétiques sous dose maximale de statine. Il n'y a pas eu de conversion significative vers un état diabétique après traitement avec Alirocumab comparé au placebo (9,3% vs 10,4%). La variation de l'hémoglobine glyquée HbA1c (biomarqueur permettant l'estimation de la glycémie des 3 derniers mois) était similaire dans le groupe Alirocumab et dans le groupe placebo (5,64% vs 5,65%) (Colhoun et al., 2016). Par ailleurs, l'étude ODYSSEY OUTCOMES publiée en 2019 avait pour but d'étudier l'effet d'Alirocumab sur le risque de maladie cardiovasculaire chez des patients normoglycémiques, prédiabétiques ou diabétiques après 3 à 5 ans de suivi. Dans cette étude, Alirocumab a favorisé

une diminution des taux de LDL-C de 64% chez les normoglycémiques et diabétiques et de 65% chez les prédiabétiques, démontrant une efficacité similaire. En ce qui concerne le risque de développer un DT2, il n'y a pas eu de différence significative entre les normoglycémiques et les prédiabétiques. En effet, il y a eu 9,6% de nouveaux diabétiques parmi les patients ayant reçu Alirocumab contre 10,1% chez ceux traités avec le placebo. Dans le groupe normoglycémique, 3,0% des patients ayant reçu Alirocumab ont développé un diabète comparés à 2,4% dans le groupe ayant reçu le placebo. Parmi les prédiabétiques ayant reçu Alirocumab, 13,8% ont développé un diabète comparés à 15,3% avec le placebo **(Figure 30)** (Ray et al., 2019b). Ces différences sont non significatives.

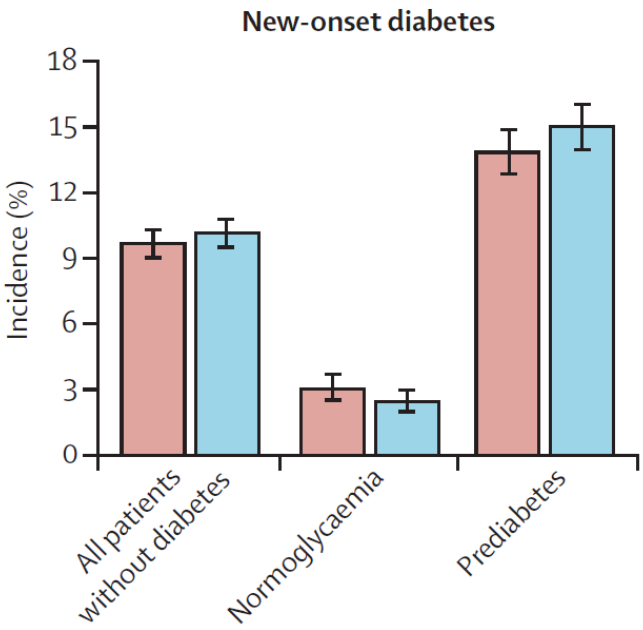


Figure 30 : Effet d'Alirocumab sur l'incidence de développer un DT2 (extraite de Ray et al., 2019). L'injection d'Alirocumab n'a pas induit d'augmentation significative de nouveau cas de DT2.

Dans l'essai clinique DESCARTES, l'impact d'Evolocumab sur les paramètres glycémiques a été évalué sur 905 patients après 52 semaines de traitements avec Evolocumab. L'incidence de nouveaux cas de diabète n'a pas varié significativement entre les patients traités par

Evolocumab et ceux ayant reçu le placebo (5,6% vs. 6,6%). La conversion des individus prédiabétiques en diabétiques a été de 10,3% chez les patients traités et de 14,1% chez les témoins. Pour les patients normoglycémiques, la conversion d'un état non diabétique à un état diabétique a été de 2,7% pour le groupe Evolocumab et 1,9% pour le groupe placebo témoin (Blom et al., 2017). L'étude de deux autres essais cliniques d'Evolocumab, OSLER1 et OSLER2 (Open-Label Study of Long-Term Evaluation against LDL Cholesterol) a eu pour but d'étudier les effets de l'anticorps anti PCSK9 sur la glycémie à jeun, l'HbA1c et le risque de développer un diabète de type 2. Dans l'étude OSLER1 les patients ont reçu Evolocumab en complément d'un traitement à l'ézétimibe ou statine tandis que dans OSLER2 les patients ont reçu uniquement Evolocumab. Après 48 semaines le taux d'HbA1c et la glycémie à jeun sont restés inchangés dans les 2 groupes. L'injection d'Evolocumab seul ou en complément d'un traitement à l'ézétimibe ou statine n'a pas induit de conversion significative d'un état non-diabétique vers un état diabétique (Sattar et al., 2017). Les paramètres glycémiques et la survenue de nouveaux cas de diabètes ont aussi été évalués dans une étude *post-hoc* de l'essai clinique FOURIER. Sur l'ensemble des 27 564 patients, 16 533 (60%) n'étaient pas diabétiques au moment de l'inclusion. Parmi ces 16 533 patients 10 344 étaient prédiabétiques et les autres non diabétiques. L'injection d'Evolocumab n'a pas entrainé de différence significative dans le pourcentage de conversion des non diabétiques en diabétique comparée au placebo au bout de 3 ans (11,6% vs 10,3%) **(Figure 31)**. En accord avec ces résultats, les niveaux d'HbA1c et la glycémie à jeun étaient similaires dans les groupes ayant reçu Evolocumab et le placebo (Sabatine et al., 2017b).

.

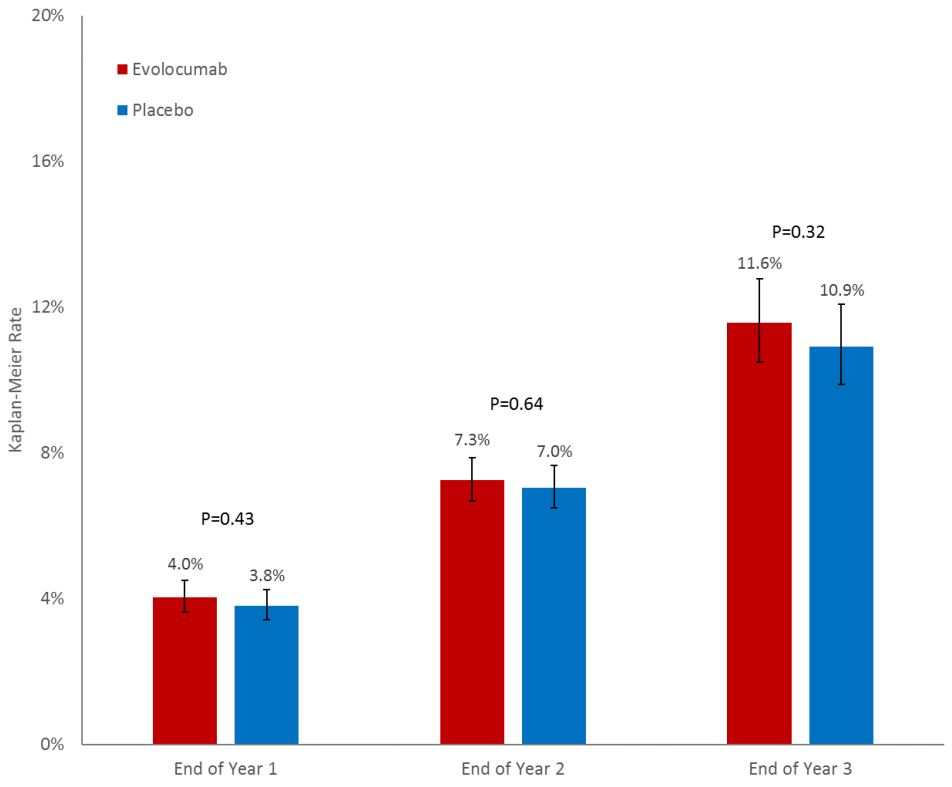


Figure 31 : Effet d'Evolocumab sur l'incidence de développer un DT2 (extraite de Sabatine et al., 2017). L'injection d'Evolocumab n'a pas induit d'augmentation significative de nouveaux cas de DT2.

De même, dans l'étude SPIRE sur Bococizumab, après 52 semaines de traitement il n'y a pas eu d'effet significatif sur l'incidence de nouveau cas de diabète ni sur la variation de l'hémoglobine glyquée. En revanche, la glycémie à jeun a significativement augmenté de 1,74% après cette période dans le groupe traité comparé au placebo (Ridker et al., 2017).

En 2018, une méta-analyse regroupant 26 123 non-diabétiques de 18 essais cliniques impliquant Alirocumab et Evolocumab a été effectuée. Cette étude avait pour but d'investiguer les effets des anticorps monoclonaux anti-PCSK9 sur l'apparition de nouveaux cas de diabète. L'incidence de la survenue du diabète n'a pas été différente entre le groupe traité et le groupe contrôle. En effet, parmi les patients qui ont reçu un anticorps anti-PCSK9, 6,65% ont développé un diabète contre 6,74% dans le groupe placebo. Aucune différence significative n'a

été reportée concernant la glycémie à jeun et l'HbA1c (Cao et al., 2018). Une nouvelle étude mendélienne randomisée a été réalisée par l'équipe du Pr. Blaha. Cette étude a inclus 163 688 patients non diabétiques sous statine. Le risque de développer un DT2 après utilisation d'inhibiteurs de PCSK9 n'a pas été différent du risque lié à l'administration d'un placebo (Khan Safi U. et al., 2019).

Les transformations hémorragiques après traitement hypolipémiant – Dans l'étude SPARCL (The Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels) réalisée en 2006 par le Pr. Amarenco, 4 731 patients ayant fait un AVC ou une ischémie transitoire de moins de 6 mois ont été recrutés. L'étude avait pour but de déterminer si des hautes doses de statines réduisaient le risque de refaire un AVC. Il en ressort qu'après traitement à 80mg d'atorvastatine les taux de LDL-C ont diminué de 53% et le risque de refaire un AVC de 18% (Investigators, 2009). Une des complications des AVCs est la transformation hémorragique. Il s'agit d'infiltration de sang au niveau de la zone ischémiée due à la rupture de petits vaisseaux et/ou à l'altération de l'intégrité de la barrière hématoencéphalique (Lapchak, 2002). Dans l'étude SPARCL, 62% de patients ayant fait une transformation hémorragique étaient sous 80mg d'atorvastatine et avaient un LDL-C réduit (Investigators, 2009). Les effets des inhibiteurs de PCSK9 sur les transformations hémorragiques ont été évalués. L'injection d'Alirocumab ou d'Evolocumab n'a pas induit d'augmentation de complications hémorragiques après une AVC (Jukema J. Wouter et al., 2019; Sabatine et al., 2017a).

Les anticorps monoclonaux dirigés contre PCSK9 ont été approuvés par la FDA en 2015. L'injection de ces médicaments a induit une diminution des maladies cardiovasculaires. Les études sur la survenue du DT2 après traitements sont pour le moment rassurantes. Néanmoins, des études plus approfondies sont à entreprendre et notamment sur les cellules bêta pancréatiques humaines.

III. Le diabète de type 2

Le glucose constitue une source d'énergie pour nos cellules. La concentration de glucose sanguine, ou glycémie, est un paramètre finement régulé. Différents organes comme le cerveau, le pancréas, le foie, l'intestin, les muscles et tissus adipeux sécrètent des hormones ou peptides assurant le contrôle de la glycémie. Le pancréas joue un rôle fondamental dans ce contrôle. En effet, les cellules β et α des îlots de Langerhans du pancréas sécrètent les hormones insuline et glucagon qui sont hypo- et hyperglycémiantes, respectivement. Des perturbations dans ce mécanisme de régulation peuvent entraîner des maladies métaboliques comme le diabète (Röder et al., 2016). L'apparition du diabète peut engendrer à terme des complications micro- et macro-vasculaires et accroit substantiellement le risque de maladies cardiovasculaires (Rawshani et al., 2017).

1. Définition et étiologie

Le diabète est défini selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) comme étant une « maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser efficacement l'insuline qu'il produit. Il en résulte une concentration accrue de glucose dans le sang » (Organization, 1999). Ainsi, l'EASD (European Association for the Study of Diabetes) définit des valeurs seuils de la glycémie et de l'hémoglobine glyquée A1c (HbA1c) caractérisant des états de normoglycémies, prédiabètes et diabètes. L'HbA1c est un marqueur de contrôle de la glycémie. Elle reflète la moyenne de la glycémie des 3 derniers mois (World Health Organization, 2011). En effet, la fraction A1c de l'hémoglobine représente 60% à 80% des hémoglobines glyquées. La glycation est une réaction non-enzymatique au cours de laquelle un sucre est fixé à la partie N-terminale des protéines. La formation d'hémoglobine glyquée dépend donc de la glycémie. Cette mesure doit être effectuée à 2 reprises pour établir le diagnostic de façon certaine. La glycémie est prise à jeun

ou 2h après une prise orale de 75g de glucose pour le test OGTT (Oral Glucose Tolerance Test). Ces seuils ne s'appliquent pas chez les femmes enceintes. En effet, des seuils différents définissent le diabète gestationnel. Une mesure de la glycémie normale est inférieure à 110mg/dL (6,1mmol/L) à jeun ou inférieure à 140mg/dL (7,8mmol/L) lors de l'OGTT. Une mesure de la glycémie comprise entre 110mg/dL et 125mg/dL (6,9mmol/L) à jeun et entre 140mg/dL et 200mg/dL (11,1mmol/L) lors de l'OGTT est caractéristique d'un prédiabète. Une mesure de la glycémie supérieure à 126mg/dL (7,0mmol/L) à jeun ou supérieure à 200mg/dL lors de l'OGTT est caractéristique du diabète. Un taux d'HbA1c supérieur à 6,5% (48mmol/mol) est aussi un marqueur du diabète **(Figure 32)** (Cosentino et al., 2020).

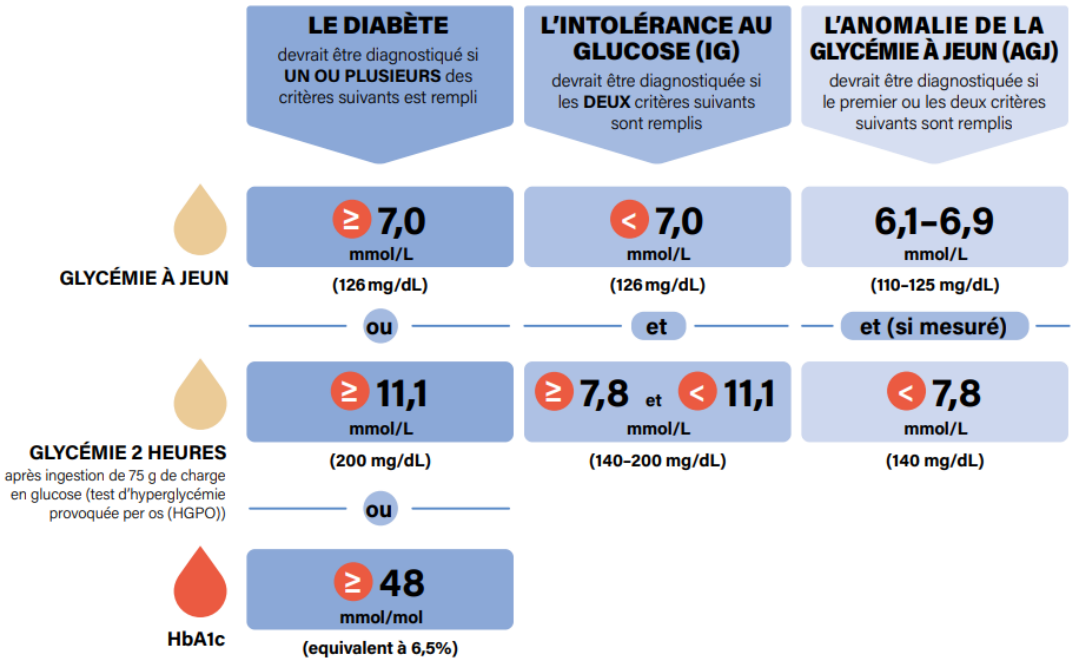
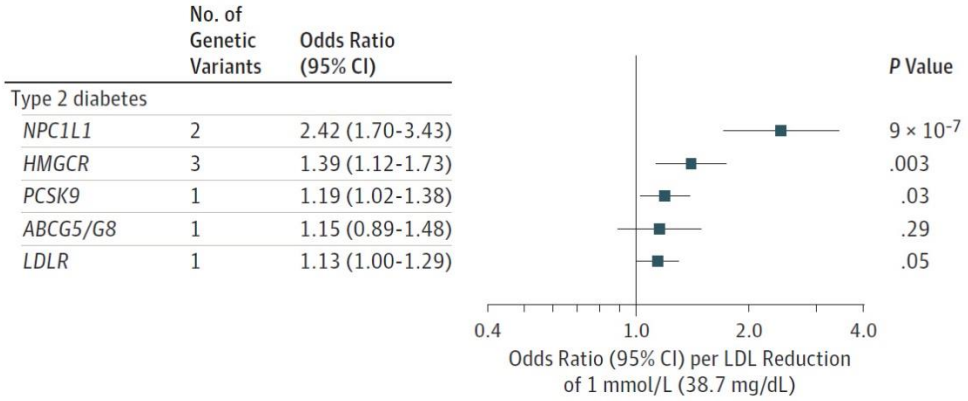


Figure 32 : Critères de diagnostic du diabète (extraite de Fédération Internationale du Diabète, 2019). L'EASD définit des valeurs seuils de la glycémie et de l'HbA1c caractérisant des états de normoglycémie, prédiabète et diabète. Les différentes valeurs cibles à atteindre sont reportés dans cette figure.

Il existe plusieurs types de diabète. Les plus fréquent sont le diabète de type 1 (7% à 12%) et le diabète de type 2 (DT2) (87% à 91%). Les autres cas de diabète représentent 1% à 3%

(Organization, 1999). Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune. Il est causé par une déficience totale en insuline et une hyperglycémie majeure causées par l'élimination des cellules β pancréatiques par les lymphocytes T (American Diabetes Association, 2014). Le DT2 est une maladie métabolique chronique résultant de facteurs génétiques et environnementaux.

Dans l'étude en population Framingham Offsring Study, le risque de transmission de DT2 des parents à leur descendance a été évalué. Cette étude a inclus 2 527 descendants dans 1 303 familles. Les taux de diabète maternel et paternel étaient de 23,6% et 25,6%, respectivement. Parmi les descendants de ces familles, 76,3% n'avaient pas de parents diabétiques, 10,5% avaient une mère diabétique, 11,5% avaient un père diabétique et 1,7% avaient les deux parents diabétiques. Le risque de développer un DT2 était 3,5 fois plus grand chez les descendants avec un parent diabétique et 6 fois plus grand chez les descendants avec les 2 parents diabétiques comparés aux descendants avec les parents non diabétiques, ce qui a indiqué une contribution de la génétique dans le DT2 (Meigs et al., 2000). Ainsi, des études du génome GWAS (Genome Wide Association Study) ont identifié plus de 130 variants génétiques associés au DT2, à la glycémie et à l'insulinémie. Ces variants expliquent 15% du nombre de diabétiques (Skyler et al., 2017). Des études Mendéliennes randomisées ont montré que des mutations sur les gènes de *PCSK9*, *HMGCR*, *NPC1L1* et *LDLR*, impliqués dans le métabolismes des lipoprotéines, sont corrélées avec l'incidence d'apparition du DT2 **(Figure 33)** (Ference et al., 2016; Lotta et al., 2016). Cependant, de telles variations génétiques ne sont pas suffisantes à elles seules pour expliquer le taux croissant d'individus diabétiques dans la population. Les facteurs environnementaux jouent eux aussi un rôle majeur dans la survenue de la pathologie. En effet, l'obésité, la composition du microbiote, le manque d'activité physique, les polluants et les perturbateurs endocriniens favorisent l'insulinorésistance et un déficit sécrétoire de l'insuline se traduisant par un DT2 (Skyler et al., 2017).



	No. of Genetic Variants	Odds Ratio (95% CI)	P Value
Type 2 diabetes			
NPC1L1	2	2.42 (1.70-3.43)	9×10^{-7}
HMGCR	3	1.39 (1.12-1.73)	.003
PCSK9	1	1.19 (1.02-1.38)	.03
ABCG5/G8	1	1.15 (0.89-1.48)	.29
LDLR	1	1.13 (1.00-1.29)	.05

Figure 33 : Association entre variants génétiques et incidence de développer un DT2 (extraite de Lotta et al., 2016). Des mutations sur les gènes NPC1L1, HMGCR, PCSK9, ABCG5/G8 et LDLR associées à une diminution de taux de LDL augmentent de façon significative le risque de développer un DT2.

2. Physiopathologie du diabète de type 2

En réponse à l'augmentation de la glycémie après une prise alimentaire, les cellules β des îlots de Langerhans sécrètent l'insuline. Cette hormone agit à des sites différents pour réguler la glycémie. En effet, l'insuline inhibe la néoglucogenèse et la glycogénolyse principalement hépatique et augmente le captage du glucose par les cellules musculaires, les hépatocytes et les adipocytes. La liaison de l'insuline à son récepteur INSR induit l'autophosphorylation des résidus tyrosine du récepteur. Cette phosphorylation permet le recrutement d'autres protéines comme le substrat au récepteur à l'insuline (IRS). La phosphorylation d'IRS favorise le recrutement de protéines impliquées dans la transduction du signal comme la phosphatidyl-inositol-3 kinase (PI3K). L'activation de PI3K induit une cascade de signalisation aboutissant à la translocation de transporteurs du glucose GLUT, qui se trouve dans le cytosol, vers la surface de ces cellules **(Figure 34)**. Les transporteurs GLUT4 sont retrouvés au niveau des cellules musculaires et les GLUT1/2 au niveau des cellules β pancréatiques (Pessin and Saltiel, 2000; Gatta, 2008).

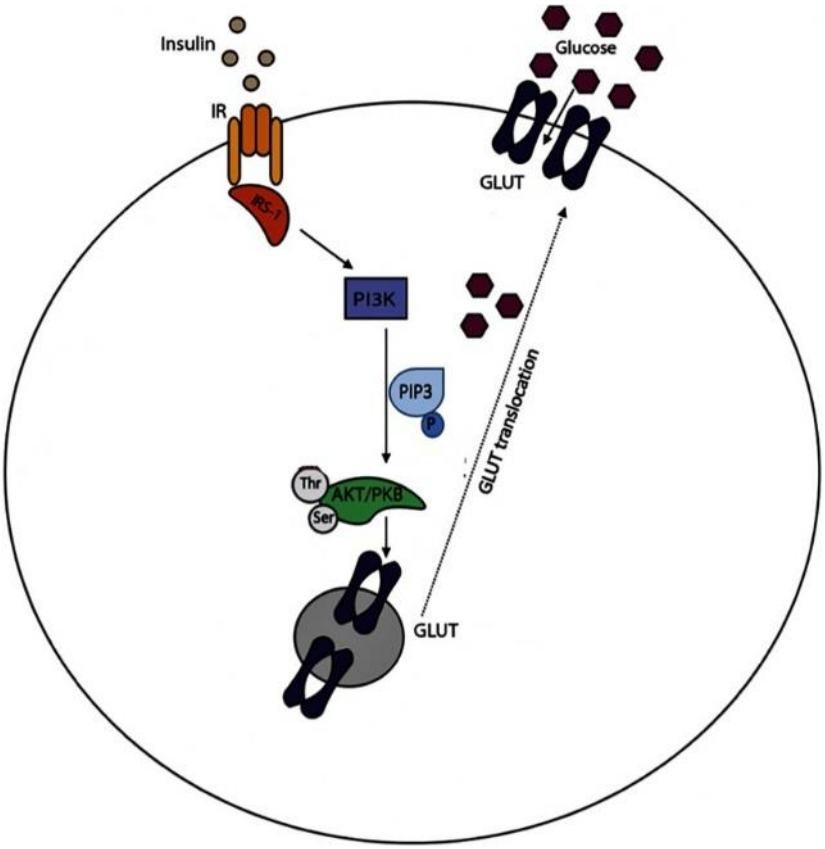


Figure 34 : Activation du récepteur à l'insuline et translocation de GLUT à la membrane (extraite et adaptée de Castriota et al., 2020). La liaison de l'insuline à son récepteur INSR induit une cascade de signalisation aboutissant à la translocation du transporteur de glucose GLUT, du cytosol vers la surface des cellules

Lorsque les concentrations normales en insuline ne suffisent plus à réguler la glycémie, on assiste à une résistance à l'insuline (insulinorésistance). L'insulinorésistance est une altération de la transduction du signal (Pessin and Saltiel, 2000). Elle se développe avec un dépôt ectopique de lipides dans le foie, les muscles et le pancréas (van der Zijl et al., 2011). Pour pallier la résistance à l'insuline, la masse de cellule β augmente de 50% à 90% chez les personnes obèses. En 2003, l'équipe du Dr. Butler a réalisé une étude sur des tissus d'autopsies humaines. Dans cette étude, 124 sujets ont été inclus et classés suivant leur indice de masse corporelle et leur suivi de la glycémie. Le volume des cellules β pancréatiques était 50% plus élevé chez les sujets obèses non diabétiques comparés aux contrôles normaux pondéraux

(Butler et al., 2003). D'autres études ont montré que les cellules β pancréatiques des patients à risque produisent et sécrètent d'avantage d'insuline. Ainsi, les individus obèses non diabétiques ont une hypersécrétion d'insuline (Ferrannini et al., 1997). Lorsque la réponse compensatoire des cellules β n'est plus suffisante face à l'insulinorésistance, le DT2 apparaît. En effet, l'hypersécrétion d'insuline augmenterait la susceptibilité du stress du RE au niveau des cellules β et induirait leur apoptose (Donath et al., 2005). De nombreuses études associent l'apparition du DT2 à une perte de 24% à 65% de la masse de cellules β par apoptose (Butler et al., 2003; Yoon et al., 2003; Rahier et al., 2008; Chen et al., 2017). L'étude de pancréas de 14 donneurs diabétiques et non diabétique a montré que le nombre d'îlots de Langerhans diminue de 2,3 fois chez les patients diabétiques (Deng et al., 2004). Cette réduction de la masse de cellule β se caractérise par une réduction de 50% à 97% de la sécrétion d'insuline (Chen et al., 2017). Outre l'apoptose des cellules β induite suite à l'hypersécrétion d'insuline, d'autres facteurs comme l'accumulation de lipides au niveau du pancréas pourraient également être impliqués dans l'apparition du DT2. Différentes études montrent que les lipoprotéines peuvent moduler la sécrétion d'insuline et la survie des cellules β pancréatiques (Roehrich et al., 2003; Kruit et al., 2010a). Dans une étude réalisée par Rütti et ses collègues, l'incubation d'îlots pancréatiques isolés avec des doses croissantes de LDL a induit une diminution de la sécrétion d'insuline suite à une stimulation au glucose (GSIS) **(Figure 35)** (Rütti et al., 2009). Ces études indiquent une lipotoxicité au niveau pancréatique et soulignent le rôle majeur des cellules β dans l'apparition du DT2.

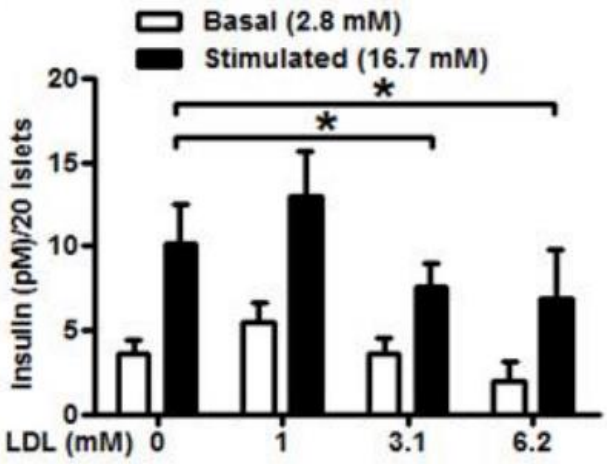


Figure 35 : Diminution de la sécrétion d'insuline suite à une stimulation au glucose en présence de LDL (extraite de Rütti et al., 2009). L'incubation d'îlots de Langerhans humains isolés en présence de doses croissantes de LDL a induit une diminution du GSIS après stimulation avec 16,7mM de glucose.

3. La cellule bêta

La sécrétion d'insuline – La cellule β pancréatique fait partie du pancréas endocrine et sécrète l'insuline. Le pancréas est une glande digestive se situant entre le duodénum, à droite, et la rate, à gauche. Il est divisé en 4 parties : la tête, le cou, le corps et la queue. La tête se situe au-dessus des veines cave et rénale inférieures et proche du duodénum tandis que la queue s'étend jusqu'à la rate. C'est un organe vascularisé et innervé. Les cellules acineuses et ductales du pancréas produisent des sécrétions digestives exocrines qui entrent dans le duodénum par les canaux pancréatiques. Le pancréas produits également des sécrétions endocrines, au niveau des îlots de Langerhans, qui passent dans la circulation sanguine par la veine porte (Talathi and Young, 2020).

Le pancréas est composé de 80% de cellules exocrines et 1-2% de cellules endocrines (Röder et al., 2016; Talathi and Young, 2020). Les cellules endocrines sont organisées en structures particulières. Ce sont les îlots de Langerhans. La composition de ces îlots diffère en fonction

des espèces (Steiner et al., 2010). Chez l'Homme, les îlots de Langerhans sont constitués à 10% de cellules δ sécrétant la somatostatine, de cellules γ sécrétant le polypeptide pancréatique, de cellules ϵ sécrétant la grhéline. Les cellules α qui sécrètent du glucagon constituent 30% des îlots et les cellules β qui sécrètent l'insuline en constituent environ 60% (Ionescu-Tirgoviste et al., 2015; Steiner et al., 2010). Contrairement à ceux des Hommes, les îlots de Langerhans de souris ont une organisation différente. En effet, chez l'Homme les cellules des îlots sont distribuées de façon aléatoire tandis que chez la souris, les cellules β sont entourées par les autres types cellulaires **(Figure 36)** (Steiner et al., 2010; Da Silva Xavier, 2018).

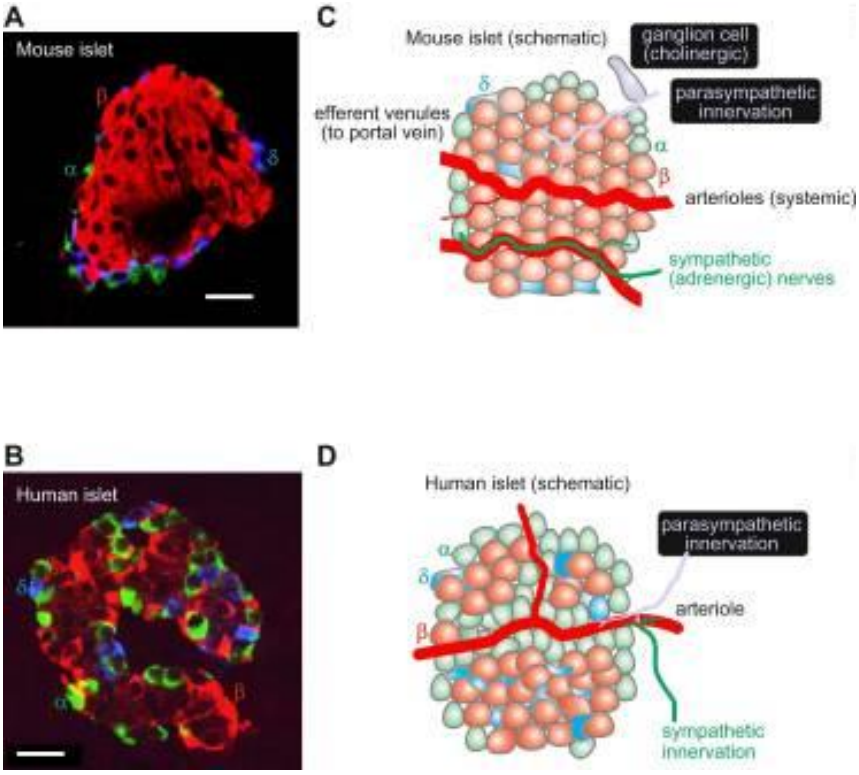


Figure 36 : Différence structurale entre les îlots de Langerhans humains et murins (extraite de Rorsman and Ashcroft, 2018). Les îlots de Langerhans de souris ont une organisation différente. Chez l'Homme les cellules des îlots sont distribuées de façon aléatoire tandis que chez la souris, les cellules β sont entourées par les autres types cellulaires.

Les cellules β pancréatiques sont spécialisées dans la sécrétion d'insuline, seule hormone hypoglycémiante connue et sous un contrôle métabolique strict. Son expression se fait

principalement sous la dépendance du facteur de transcription PDX-1. L'insuline est synthétisée sous forme de pré-pro insuline (110 acides aminés) avec un peptide signal, une chaîne B (30 acides aminés), un peptide C et une chaîne A (21 acides aminés). La délétion du peptide signal au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER) aboutit à la formation de la pro-insuline. La pro-insuline est transportée vers le Golgi dans des vésicules sécrétoires. L'environnement golgien riche en zinc et calcium favorise la formation d'hexamères de pro-insulines, forme de stockage. Des réactions enzymatiques en dehors du Golgi faisant intervenir PCSK1 et PCSK2 convertissent la pro-insuline en insuline mature et peptide C (Jansen et al., 1995; Wilcox, 2005; Marchetti et al., 2017).

Lors d'une prise alimentaire, des neurotransmetteurs, le glucose et des hormones initient l'exocytose des vésicules d'insuline. Le glucose est le principal initiateur de la sécrétion d'insuline. D'autres biomolécules potentialisent son effet. Après stimulation au glucose, celui-ci entre dans la cellule β par les transporteurs GLUT1 et GLUT2. Son entrée dans la cellule β pancréatique entraîne l'activation de la glycolyse. Le pyruvate, produit final de la glycolyse, est ensuite transformé en acétyl-CoA puis en citrate et intègre le cycle de Krebs. L'activation du cycle de Krebs permet la formation de NADH et FADH2 pris en charge au niveau de la chaîne respiratoire et aboutissant à la production d'ATP. L'augmentation du ratio ATP sur ADP dans la cellule β induit la fermeture des canaux potassium ATP dépendants constitués de 4 sous unités protéiques SUR1 (Sulphonylurea 1 receptor) et de 4 sous unités protéiques Kir6.2. Il en résulte une dépolarisation de la membrane plasmique qui provoque l'ouverture de canaux calciques voltages dépendants. L'entrée massive d'ions calcium dans la cellule est le phénomène déclenchant l'exocytose des vésicules d'insuline **(Figure 37)** (Marchetti et al., 2017). Ainsi, suite à une stimulation au glucose les cellules β sécrètent des vésicules d'insuline. Il s'agit du GSIS (glucose-stimulated insulin secretion).

En 1993, l'équipe du Dr. Henquin a montré que la sécrétion d'insuline suivait la variation d'ions calcium cytoplasmiques mettant en évidence la sécrétion pulsatile d'insuline (Gilon et al., 1993). De plus, il a été montré que la sécrétion d'insuline est biphasique. Après la stimulation au glucose, une première phase initiatrice aboutit à la sécrétion d'insuline qui diminue dans les minutes qui suivent. Une seconde phase d'amplification débute juste après la baisse de la sécrétion de la première phase. Il en résulte une sécrétion moindre d'insuline qui dure jusqu'au retour de la glycémie à la normale. Le caractère biphasique de la sécrétion d'insuline est lié à la présence de pools de granules d'insuline différents. Il y a des granules prêtes à être sécrétées proche de la membrane et des granules de réserve. Lors de la phase initiatrice c'est principalement l'entrée en masse d'ions calcium qui induit la sécrétion des granules. La seconde phase est déclenchée par des produits du métabolisme glucidique tels que le NADPH et le GTP **(Figure 37)** (Rorsman and Renström, 2003; Vega-Monroy and Fernandez-Mejia, 2011).

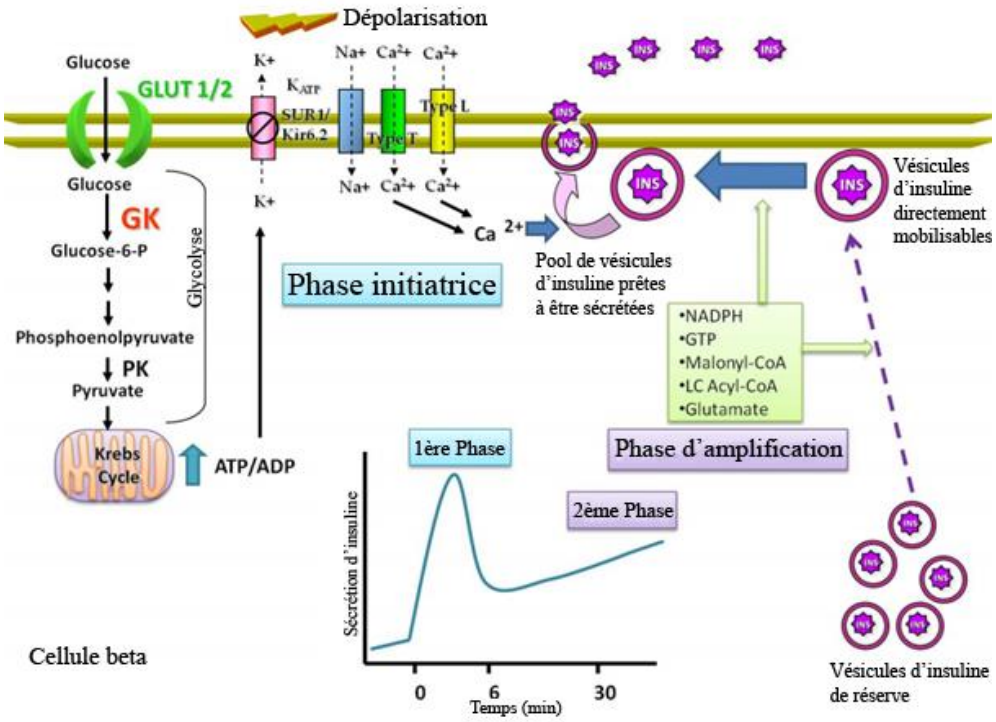


Figure 37 : Sécrétion biphasique d'insuline par la cellule β pancréatique suite à une stimulation au glucose (extraite et traduite de Vega-Monroy and Fernandez-Mejia, 2011). L'entrée du

glucose dans la cellule β pancréatique induit l'activation de la glycolyse. Le pyruvate formé est transformé en acétyl-CoA qui active le cycle de Krebs et favorise la production d'ATP. L'augmentation du ratio ATP sur ADP dans la cellule β induit la fermeture des canaux potassium ATP dépendants. Il en résulte une dépolarisation de la membrane plasmique qui provoque l'ouverture de canaux calciques voltage dépendants et l'entrée massive d'ions calcium dans la cellule. C'est le phénomène déclenchant l'exocytose des vésicules d'insuline. C'est la première phase initiatrice. La seconde phase est déclenchée par des produits du métabolisme glucidique tels que le NADPH et le GTP. Il en résulte une sécrétion moindre d'insuline qui dure jusqu'au retour de la glycémie à la normale. Le caractère biphasique de la sécrétion d'insuline est lié à la présence de pools de granules d'insuline différents.

D'autres molécules comme les acides gras ou les acides aminés alanine et glutamine peuvent amplifier la sécrétion d'insuline. De plus, ces acides aminés favorisent la sécrétion des hormones incrétines GIP (Gastric inhibitory polypeptide) et GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) par les cellules intestinales K et L, respectivement. Ces hormones agissent directement sur les cellules β. En se liant à leurs récepteurs présents à la surface de ces cellules, elles augmentent la sécrétion d'insuline. C'est l'effet incrétine (Fu et al., 2013). Les récepteurs de GLP-1 et GIP sont couplés à une protéine G. La liaison des incrétines à leurs récepteurs entraîne d'abord l'activation de la protéine G et ensuite de l'adénylate cyclase qui convertit l'ATP en AMPcyclique (AMPc). L'AMPc active à son tour la protéine kinase A (PKA) et l'Epac2 (exchange protein directly activated by cAMP 2). La PKA inhibe les canaux potassium ATP dépendant et active les canaux calciques. L'activation d'Epac2 favorise l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire en mobilisant les réserves de calcium intracellulaires. Ainsi, par ces 2 mécanismes, les incrétines augmentent l'exocytose des vésicules d'insulines et potentialisent le GSIS (Röder et al., 2016). Le GLP-1 seul n'a pas d'effet, il faut du glucose pour favoriser l'augmentation du GSIS.

Les cellules α et le glucagon – A l'inverse, lorsque la glycémie est basse les cellules α du pancréas sécrètent le glucagon, une hormone hyperglycémiante. Cette hormone est sécrétée durant le sommeil et entre les repas. Elle promeut la glycogénolyse pour augmenter la glycémie après fixation à son récepteur principalement au niveau hépatique (Röder et al., 2016). Tout comme la sécrétion d'insuline, le glucagon est aussi sous contrôle métabolique.

PCSK9 et l'insuline – En 2003, l'équipe du Pr. Seidah a mis en évidence la présence d'ARNm de *Pcsk9* dans des lignées de cellules β pancréatiques de rat et de souris (Seidah et al., 2003). En 2006, l'équipe du Pr. Krempf s'est intéressée à la régulation nutritionnelle de PCSK9 dans un modèle murin. Ils ont mis en évidence une diminution de 73% de l'expression de l'ARNm de *Pcsk9* hépatique après 24h de jeûne. A l'inverse, les taux d'ARNm de *Pcsk9* hépatique ont augmenté d'un facteur 5 en présence d'insuline (Costet et al., 2006). En utilisant des hépatocytes de rat, Miao et ses collègues ont également montré que l'insuline augmentait l'expression de *Pcsk9* (Miao et al., 2015). Ces études établissent un lien entre l'insuline, et donc les cellules β pancréatiques, et PCSK9. En 2010, l'équipe du Pr. Scott a étudié l'effet de l'inactivation de *Pcsk9* sur la régulation de la glycémie et la sécrétion d'insuline. Les souris *Pcsk9* knockout présentaient une glycémie à jeun supérieure à celle des souris sauvages. L'insulinémie à jeun des souris *Pcsk9* knockout était diminuée de moitié par rapport aux souris sauvages. Après une stimulation au glucose, l'insulinémie des souris *Pcsk9* knockout n'a pas varié et est restée à un niveau basal **(Figure 38)** (Mbikay et al., 2010). Récemment, une étude a confirmé la diminution de l'insulinémie et l'augmentation de la glycémie à jeun chez des souris *Pcsk9* knockout (Da Dalt et al., 2018). Des analyses histologiques de pancréas de souris *Pcsk9* knockout ont révélé une irrégularité morphologique des îlots de Langerhans pouvant expliquer le défaut de sécrétion d'insuline. En effet, les îlots de ces souris apparaissent plus larges que ceux des souris sauvages (Mbikay et al., 2010; Da Dalt et al., 2018).

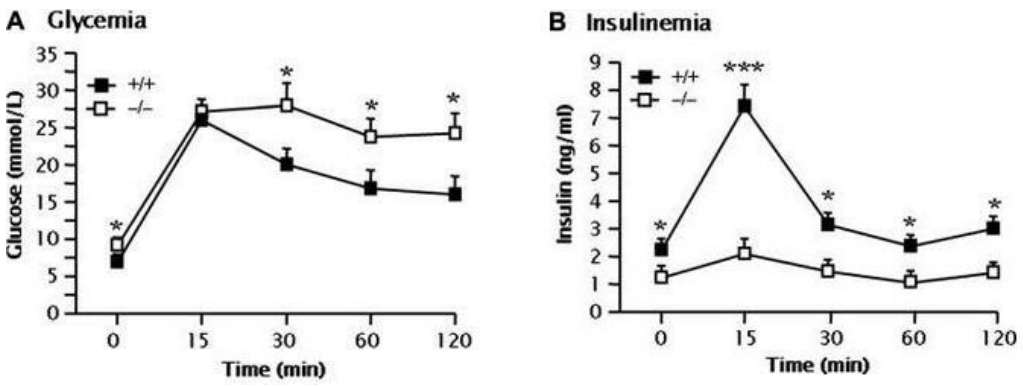


Figure 38 : Variation de la glycémie et de l'insulinémie des souris Pcsk9 knockout après stimulation au glucose (extraite de Mbikay et al., 2010). Les souris Pcsk9 knockout (carré blanc) présentaient une glycémie à jeun supérieure à celle des souris sauvages (carré noir) après une stimulation au glucose. L'insulinémie à jeun des souris Pcsk9 knockout était diminuée de moitié par rapport aux souris sauvages. Après un OGTT, l'insulinémie des souris Pcsk9 knockout n'a pas varié et est restée à un niveau basal.

Bien que l'équipe du Pr. Scott ait localisé PCSK9 au niveau des cellules β pancréatiques, d'autres équipes l'ont localisé au niveau des cellules δ des îlots de Langerhans (Langhi et al., 2009; Mbikay et al., 2010; Da Dalt et al., 2018). Les données de la littérature sont conflictuelles à ce sujet. Néanmoins dans les îlots de Langerhans, l'ARNm de *PCSK9* a été retrouvé uniquement au niveau des cellules β pancréatiques (Seidah et al., 2003; Ndiaye et al., 2017).

4. Les traitements du diabète de type 2

Le DT2 est la conséquence d'une dérégulation de la sécrétion d'insuline ou de la perte de sensibilité des cellules périphériques à l'insuline. Afin de réguler la glycémie plusieurs stratégies peuvent être mises en place. Il peut soit s'agir de modification de l'hygiène de vie soit de traitements antidiabétiques médicamenteux.

Modification de l'hygiène de vie – Des études épidémiologiques ont montré que l'incidence du DT2 est liée à 91% à l'hygiène de vie : suralimentation, manque d'activité physique, surpoids

et obésité, tabagisme et alcool, par exemple (Hu et al., 2001). Ainsi, des changements radicaux de l'hygiène de vie, comme la perte de poids et l'augmentation de l'activité physique, chez les individus prédisposés, peuvent prévenir ou retarder la conversion à un état de diabétique de type 2 (Chen et al., 2012). Dans une étude clinique, 3 234 prédiabétiques avec un IMC à 34 en moyenne ont été inclus. Le but de cette étude était de voir l'incidence d'apparition du DT2 après un traitement à la metformine ou après modification de l'hygiène de vie comparée au placebo. La modification de l'hygiène de vie consistait à faire perdre 7% du poids aux individus, à faire 150 minutes de sport par semaine et à modifier les habitudes alimentaires en diminuant l'apport calorique de 450±26 kcal. Après 2,8 ans de suivi en moyenne, l'incidence du DT2 était de 11% pour le groupe placebo, de 7,8% pour le groupe metformine et de 4,8% pour le groupe avec une hygiène de vie modifiée. Ainsi, il ressort que la modification de l'hygiène de vie diminue de 58% l'incidence du DT2 chez des individus prédisposés comparée au placebo (Knowler et al., 2002).

Traitements antidiabétiques pharmacologiques – Lorsque les approches visant à modifier l'activité physique et la nutrition ne sont pas suffisantes, des agents thérapeutiques oraux et injectables peuvent être prescrits. Les classes majeures d'antidiabétiques oraux sont les biguanides, les sulphonylurées, les méglitinides, les inhibiteurs des dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) et les inhibiteurs des co-transporteurs rénaux sodium-glucose (SGLT2). Des injections d'analogues du GLP-1 et d'insuline peuvent également être prescrites (Chaudhury et al., 2017). Selon les recommandations consensuelles de l'ADA (American Diabetes Association) et de l'EASD (European Association for the Study of Diabetes), les traitements antidiabétiques doivent être prescrits en fonction de leur efficacité de réduction de l'hyperglycémie, de leur tolérance et de leur sûreté. D'autres facteurs importants sont à prendre en considération comme les cibles glycémiques à atteindre, les comorbidités, les effets secondaires et le coût du traitement. Ainsi, il est recommandé d'atteindre des valeurs d'HbA1c inférieures à 7% dans le

cadre du traitement du DT2. Les valeurs de glycémie à jeun à atteindre sont personnalisées pour chaque patient (Davies et al., 2018).

Biguanide – La plante *Galega officinalis* était traditionnellement utilisée pour son effet antidiabétique. Elle possède des composés actifs tels que les guanidines, galégines et biguanides qui diminuent la glycémie. La metformine est un antidiabétique oral appartenant à la classe des biguanides. Ce médicament est prescrit en première intention après la modification de l'hygiène de vie aux diabétiques de type 2. La metformine diminue la glycémie par plusieurs mécanismes (Davies et al., 2018). Après son absorption au niveau de l'intestin grêle, la metformine est délivrée au niveau hépatique. Dans le foie, elle active la kinase LKB1 (Liver Kinase B1) qui active à son tour l'AMPK (Adenosine Monophosphate activated Protein Kinase) et la SIK (Salt-inducible kinase). La cascade de signalisation résultant de la phosphorylation de ces kinases diminue la néoglucogenèse hépatique. Au niveau des tissus périphériques, la metformine augmente la sensibilité à l'insuline en activant l'expression du récepteur à l'insuline (Shaw et al., 2005; Viollet et al., 2012; Song, 2016). La metformine est également capable d'inhiber l'action du glucagon. En effet, l'équipe du Dr. Birnbaum a montré que la metformine conduit à une accumulation de l'AMP au niveau hépatique qui inhibe l'adénylate cyclase. L'inhibition de l'adénylate cyclase réduit les niveaux d'AMPc et donc diminue l'activité de la protéine kinase A impliquée dans l'activation du glycogène phosphorylase. Ainsi, la metformine empêche la glycogénolyse et donc le relargage de glucose dépendant du glucagon dans la circulation (Miller et al., 2013). A des hautes concentrations, 5mmol/L, la metformine est capable d'inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire (NADH coenzyme Q oxydoréductase) et de réduire les niveaux d'ATP. La diminution de l'ATP active l'AMPK qui inhibe la néoglucogenèse (El-Mir et al., 2000). La metformine peut également inhiber la glycérophosphate déshydrogénase mitochondriale. Cette enzyme est impliquée dans l'équilibre redox. Son inhibition diminue la conversion du lactate et du glycérol en glucose et la

néoglucogenèse (Madiraju et al., 2014). L'efficacité de la metformine en monothérapie sur la glycémie à jeun est très peu décrite dans la littérature. Une méta analyse conduite en 2018 sur 16 études a eu pour objectif d'évaluer l'efficacité de la metformine comparée à un placebo sur la glycémie. Dans cette étude, 1 140 patients atteints de DT2 sans traitement ont été sélectionnés. Il en ressort que la metformine diminue en moyenne de 1,92mmol/L, 1,79mmol/L et 2,14mmol/L la glycémie à jeun après 1, 3 et 6 mois de traitement, respectivement. L'HbA1c diminue en moyenne de 0,95% et de 1,32% après 1 et 6 mois de traitement à la metformine (Piera-Mardemootoo et al., 2018).

Les sulphonylurées et méglitinides – Lors du GSIS, l'entrée du glucose induit une augmentation du ratio ATP/ADP conduisant à la fermeture des canaux potassiques ATP dépendants. Ces canaux sont composés des sous unités Kir6.2 et SUR1. La fermeture de ces canaux induit une dépolarisation de la membrane, une entrée massive d'ions calcium et l'exocytose des vésicules d'insuline (Marchetti et al., 2017). Les sulphonylurées sont des sécrétagogues de l'insuline. Ils stimulent la sécrétion d'insuline principalement en se liant à la sous-unité SUR des canaux potassium ATP dépendants. En effet, la liaison de haute affinité des sulphonylurées à SUR induit la fermeture de ces canaux et mime la dépolarisation de la membrane suite à un GSIS (Proks et al., 2002). Les sulphonylurées sont prescrits en deuxième intention lors du traitement du DT2. Ces antidiabétiques oraux peuvent entrainer des hypoglycémies. Un traitement de substitution est l'utilisation de méglitinides qui sont également des sécrétagogues de l'insuline. Néanmoins, leur affinité pour SUR est plus faible que celle des sulphonylurées. (Chaudhury et al., 2017). L'efficacité des sulphonylurées sur l'HbA1c a été évaluée dans une méta-analyse. Parmi les patients inclus, 1 151 étaient sous monothérapie avec une sulphonylurée. Il ressort de cette étude que les sulphonylurées diminuent les niveaux de HbA1c de 1,51% en moyenne comparés au placebo. Dans cette même étude, 1 381 patients étaient sous traitement antidiabétiques oraux à la metformine ou

thiazolidinediones ou insuline plus sulphonylurées. Les niveaux de HbA1c étaient réduits de 1,62% en moyenne dans le groupe « antidiabétiques plus sulphonylurées » comparé au groupe « contrôle sans sulphonylurées » (Hirst et al., 2013). Les données sur les variations de la glycémie à jeun sont plus rares. La supplémentation de la metformine avec un sulphonylurée induit une diminution de 1,36% des taux de HbA1c et de 2,3mmol/L la glycémie à jeun chez 320 patients suivis pendant 1 an (Hanefeld et al., 2004).

Les inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) **–** Les incrétines GIP et GLP-1 sont des hormones sécrétées par les cellules K et L intestinales. Elles se lient aux cellules β et favorisent l'exocytose des vésicules d'insuline dans la phase d'amplification (Fu et al., 2013). GIP et GLP-1 sont les substrats de la DPP-4. La peptidase les clive et les inactive. Les inhibiteurs de la DDP-4 sont des inhibiteurs compétitifs avec une haute affinité pour l'enzyme (Thornberry and Gallwitz, 2009). L'efficacité de deux inhibiteurs de DPP4, la sitagliptine et la vildagliptine, a été évaluée dans une étude clinique incluant 170 patients atteints de DT2 sous traitements antidiabétiques oraux à la metformine ou sulphonylurées ou insuline. La glycémie à jeun et l'HbA1c ont été suivies pendant 24 semaines. La sitagliptine a induit une diminution de 1,60mmol/L la glycémie à jeun et de 1% les taux de HbA1c. La vildagliptine a réduit de 0,99mmol/L la glycémie à jeun et de 0,9% les taux de HbA1c (Choe et al., 2014).

Les inhibiteurs des co-transporteurs au sodium-glucose (SGLT2) **–** Le transporteur sodium-glucose 2 est exprimé dans les tubules convolutés des reins. Ils sont responsables de la réabsorption de 90% du glucose filtré. Chez les patients atteints de DT2, le taux d'absorption du glucose par SGLT2 est augmenté, ce qui aggrave l'hyperglycémie. Des inhibiteurs de ce transporteur ont été développés récemment (Hsia et al., 2017). Dans, une méta analyse incluant 38 essais cliniques, 37 ont montré qu'un traitement avec un inhibiteur de la SGLT2 après au moins 24 semaines de traitements induit une diminution de la glycémie à jeun de 1,1mmol/L à 2mmol/L. Les données sur la glycémie n'étaient pas présentes dans le 38e essai clinique. Dans

cette même méta analyse, les 38 essais cliniques présentaient les taux de HbA1c. Après traitement, l'HbA1c a diminué de 0,6% à 0,9% (Zaccardi et al., 2016).

Les analogues du GLP-1 **–** Le GLP-1 est une incrétine a durée de vie très courte, de l'ordre de quelques minutes. De plus, l'effet incrétine est diminué chez les patients diabétiques de type 2 altérant la régulation de la glycémie. Ainsi, des analogues du GLP-1 à durée de vie longue ont été développés pour mimer l'effet incrétine chez les patients (Drucker and Nauck, 2006). Lorsque les antidiabétiques oraux ne sont pas suffisants pour réguler la glycémie des injections de ces agonistes au récepteur au GLP-1 peuvent être directement prescrites. En effet, l'administration de ces agents thérapeutiques active les récepteurs au GLP-1 et augmente l'exocytose des vésicules d'insuline suite à un GSIS (Fu et al., 2013). Dans les études qui comparent l'effet des analogues du GLP-1 en monothérapie ou en combinaison avec des antidiabétiques oraux, les taux d'HbA1c diminuent de 0,6% à 1,7% en fonction du médicament utilisé et de la dose prescrite (Hinnen, 2017). L'efficacité des agonistes du récepteur au GLP-1 seuls comparée à un placebo sur l'HbA1c et la glycémie a été étudiée dans une méta-analyse regroupant 14 464 patients. L'injection des analogues de GLP-1 une à deux fois par jour pendant 24 à 32 semaine a induit une diminution de l'HbA1c de 0,70% à 1,21%. Les réductions de la glycémie étaient comprises entre 0,73mmol/L et 1,97mmol/L (Htike et al., 2017).

Les injections d'insuline **–** Lorsque ces stratégies ne sont plus suffisantes en mono- bi- ou trithérapies, des injections d'insuline peuvent être directement prescrites et supplémenter le traitement en place. Les injections d'insuline sont envisagées lorsque le taux d'HbA1c est supérieur ou égal à 7,5% chez le patient diabétique de type 2 et elles sont prescrites systématiquement lorsque le taux d'HbA1c est supérieur à 10% après utilisation de la dose maximale des antidiabétiques oraux (Silver et al., 2018). Dans une étude incluant 1 915 patients diabétiques de type 2 avec un taux d'HbA1c à 8,6±1,5% et une glycémie à jeun à 11,1±mmol/L, l'injection d'insuline en complément d'antidiabétiques oraux a induit une diminution de 1,7%

les taux d'HbA1c et une diminution de la glycémie à jeun de 4mmol/L. Ces résultats étaient visibles à partir de 9 mois de traitement et stables jusqu'à 32 mois (Schreiber et al., 2008).

Dans le cadre du diabète de type 2, certains médicaments agissent sur les cellules β pancréatiques et favorisent la sécrétion d'insuline. D'autres agissent sur l'utilisation ou l'excrétion de glucose. Dans le cadre des maladies cardiovasculaires, les médicaments hypolipémiants semblent influencer aussi la physiologie des cellules β.

5. Les hypolipémiants et la physiologie des cellules bêta

Les statines et le DT2 **–** Les statines sont les médicaments hypolipémiants les plus prescrits au monde. En inhibant l'HMGCR, elles augmentent l'expression et l'abondance du LDLR à la surface des cellules. Il en résulte une diminution des particules de LDL-C athérogènes. Plusieurs essais cliniques ont montré les effets bénéfiques des statines sur l'incidence et la sévérité des maladies cardiovasculaires (Betteridge and Carmena, 2016).

Au-delà de leur effet sur les maladies cardiovasculaires, les statines agissent sur d'autres paramètres non lipidiques comme l'amélioration de la fonction endothéliale, la stabilisation de la plaque d'athérome, l'amélioration du potentiel antioxydant. Ce sont les effets pléiotropes des statines. Ces effets ne sont malheureusement pas tous bénéfiques et des effets secondaires très rares comme la rhabdomyolyse ou la dégénérescence neuronale peuvent survenir (Paseban et al., 2019). Ainsi, il a été montré qu'un traitement avec une statine à forte dose chez des individus prédisposés favorise l'apparition du DT2. En effet, l'incidence sur le DT2 a été rapportée pour la première fois dans l'étude JUPITER. Le but de cette étude était d'évaluer l'efficacité et la sureté de 20mg de rosuvastatine par jour comparée à un placebo. L'étude a duré 5 ans et a inclus 17 603 individus sans diabète ni maladie cardiovasculaire documentée. Chez les individus avec au moins un facteur de risque pour le DT2, les évènements cardiovasculaires majeurs ont diminué de 39% par rapport au placebo. Néanmoins, le taux de DT2 a augmenté de 28%

comparé à celui observé sous placebo (258 individus sous statine *vs.* 204 individus sous placebo sur 11 508 individus). En revanche, chez les individus sans facteur de risque pour le DT2, les évènements cardiovasculaires majeurs ont diminué de 52% et l'incidence du DT2 n'a pas augmenté par rapport au placebo **(Figure 39)** (Ridker et al., 2012). Plusieurs autres études ont depuis confirmé que les statines augmentent le risque de développer un DT2 chez les individus prédisposés (Wang et al., 2012; Crandall et al., 2017; Ko Min Jung et al., 2019).

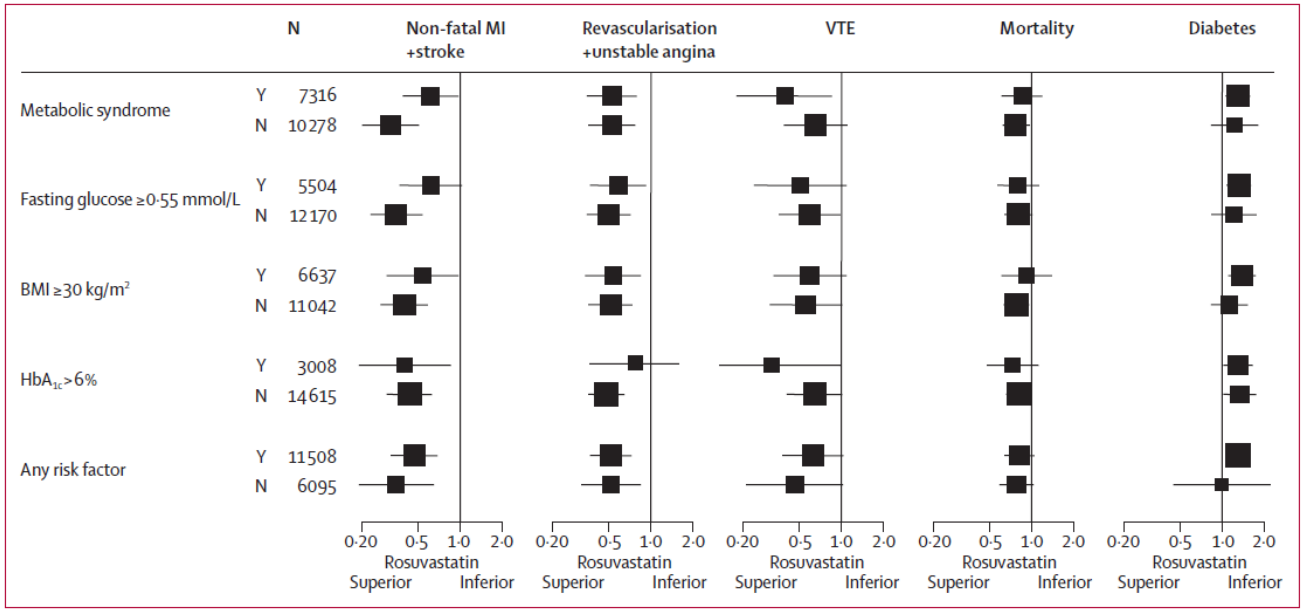


Figure 39 : Effets d'un traitement rosuvastatine sur les évènements cardiovasculaires majeurs et le DT2 chez des individus avec ou sans prédisposition (extraite de Ridker et al., 2012). Le traitement à 20mg par jour de rosuvastatine a diminué les évènements cardiovasculaires chez tous les individus. En revanche, le taux de diabétique de type 2 a augmenté de 28% chez les individus prédisposés. MI : Myocardial Infarction ; VTE : Venous Thromboembolism

Comment les statines favorisent l'apparition du DT2 ? – Plusieurs études dans la littérature ont eu pour objectif de déterminer comment les statines induisent l'apparition du DT2 suite à une longue médication sous statine. Ces hypolipémiants pourraient agir au niveau des cellules β pancréatiques et/ou au niveau des adipocytes et des tissus périphériques pour induire le DT2 (Paseban et al., 2019).

Au niveau des cellules β, comme dans tous les tissus, les statines augmentent l'expression du LDLR. Cette augmentation entraînerait une accumulation anormale de cholestérol au niveau des cellules β pancréatiques et un dysfonctionnement et/ou l'apoptose de ces cellules (Kruit et al., 2010a). Les statines pourraient aussi altérer la sécrétion d'insuline en bloquant les canaux calciques voltages dépendants. En effet, en inhibant la squalène monooxygénase, et donc la synthèse endogène de cholestérol, dans des lignées de cellules β murins et des îlots pancréatiques murins et humains, l'équipe de Xia et ses collègues a observé un blocage des canaux calciques voltages dépendants causant une diminution de la sécrétion d'insuline (Xia et al., 2008). De plus, un traitement d'îlots de Langerhans de rats avec de la simvastatine a induit également un blocage des canaux calciques et la diminution de la sécrétion d'insuline suite à une stimulation au glucose (Yada et al., 2009).

Le blocage des canaux calciques voltages dépendants pourrait être la conséquence d'une ouverture prolongée des canaux potassiques ATP dépendants de la cellule β due à une baisse de production d'ATP (Rorsman and Ashcroft, 2018). En effet, chez des rats et 6 patients, un traitement à la lovastatine a induit une réduction significative d'un composant de la chaîne respiratoire : la co-enzyme CoQ10. La diminution de la concentration en CoQ10 pourrait réduire la production d'ATP et maintenir les canaux potassiques ATP dépendants ouverts. Les canaux potassiques ATP dépendants ouverts n'entrainent pas de dépolarisation de la membrane ce qui maintient les canaux calciques voltages dépendants fermés et donc diminue la sécrétion d'insuline suite à une stimulation au glucose (Folkers et al., 1990; Rorsman and Ashcroft, 2018).

Au niveau du tissu adipeux, les statines pourraient impacter la sécrétion d'adiponectine par les adipocytes. L'adiponectine augmente la sensibilité de ces cellules à l'insuline et son inactivation dans un modèle murin entraine une résistance à l'insuline (Fu et al., 2005; Ziemke and Mantzoros, 2010). L'effet d'un traitement à 20mg ou 40mg de simvastatine comparé à un

placebo sur la sécrétion d'adiponectine a été évalué chez des patients hypercholestérolémiques. Après 2 mois de suivi, les traitements à 20mg et 40mg de simvastatine ont induit une diminution de la concentration d'adiponectine circulante de 9% et 8%, respectivement. Ces diminutions étaient associées à une perte de 6% de la sensibilité des sujets à l'insuline (Koh et al., 2011).

Au niveau des tissus périphériques, les statines pourraient également induire une insulinorésistance en modulant l'expression et la translocation des transporteurs de glucose GLUT. Sous l'action de l'insuline, les transporteurs GLUT sont dirigés vers la membrane plasmique des cellules. Le glucose est principalement capté par le transporteur GLUT4 au niveau des adipocytes et des cellules musculaires. L'inactivation de GLUT4 entraîne une résistance à l'insuline et augmente le risque de développer un DT2 (Abel et al., 2001). Chez des souris, il a été rapporté qu'un traitement à l'atorvastatine induit une diminution de l'expression de GLUT4 et une dérégulation de la glycémie (Nakata et al., 2006). De plus, d'autres observations suggèrent une baisse de réponse à l'insuline des cellules due à un effet inhibiteur des statines sur la transduction du signal après fixation de l'insuline à son récepteur (Paseban et al., 2019).

Bien qu'il existe plusieurs hypothèses dans la littérature, les mécanismes précis par lesquels les statines induisent le DT2 chez les individus prédisposés ne sont pas connus à ce jour (Paseban et al., 2019).

Les variants génétiques associés à une réduction de LDL-C et au DT2 **–** En 2015, l'équipe du Pr. Hovingh a étudié l'association entre la prévalence du DT2 et l'hypercholestérolémie familiale. L'étude d'une cohorte de patients hypercholestémiques familiaux et des membres sains de la même famille a permis de mettre en évidence une protection des patients hypercholestérolémiques familiaux contre le DT2 comparés aux membres sains de leurs familles. Cette étude a inclus 25 137 patients FH et 38 183 membres sains non FH. La prévalence du DT2 chez les patients FH était de 1,75% et 1,44% avant et après ajustement pour

l'âge, l'IMC, le HDL-C, les TG, la prise de statine, le tabagisme et les évènements cardiovasculaires. Chez les individus contrôles, la prévalence du DT2 était respectivement de 2,93% et 3,26% avant et après ajustement pour ces mêmes paramètres. Il ressort de cette étude que les patients FH ont une propension à développer un DT2 diminuée de moitié par rapport aux membres sains de leur famille **(Tableau 4)** (Besseling et al., 2015). En 2016, une méta analyse a été réalisée afin de déterminer l'impact des mutations associées à une réduction de LDL-C sur le risque de développer un DT2. Cette étude a inclus 50 775 patients avec un DT2 et 270 269 contrôles non diabétiques. Les données génétiques ont permis de mettre en évidence que des mutations associées à une réduction de LDL-C sur les gènes *NPC1L-1* (cible de l'ézétimibe), *HMGCR* (cible des statines), *PCSK9* (cible des anticorps anti-PCSK9) et *LDLR* sont associées de façon très significative à une diminution du risque de maladie cardiovasculaire mais que ces mêmes variants génétiques sont associés de façon significative à une augmentation de la survenue du DT2 (Lotta et al., 2016).

	Prevalence of Type 2 Diabetes				
	Familial Hypercholesterolemia		Unaffected Relatives		
	No. /Total	% (95% CI)	No. /Total	% (95% CI)	OR (95% CI)
Overall comparison					
Unadjusted	440/25 137	1.75 (1.59-1.91)	1119/38 183	2.93 (2.76-3.10)	0.62 (0.55-0.69)[a]
Adjusted[b]	177/12 300[c]	1.44 (1.22-1.69)	812/24 898[c]	3.26 (3.04-3.48)	0.49 (0.42-0.58)[a]

Tableau 4 : Prévalence du DT2 chez les individus FH et les membres sains de leur famille avant et après ajustement (extrait de Besseling et al., 2015). Les patients atteints d'hypercholestérolémie ont une prévalence de développer un DT2 diminuée de moitié par rapport aux membres sains de leur famille. OR : Odd ratio

La surcharge en cholestérol des cellules β pancréatiques – Divers mécanismes peuvent être à l'origine de l'apparition du DT2 après un traitement avec une statine à forte dose chez les individus prédisposés. Plusieurs hypothèses sont évoquées dans la littérature. Parmi elles, se trouve l'hypothèse de la surcharge des cellules β en cholestérol. Dans une étude réalisée en

2007, l'influence du cholestérol sur la sécrétion d'insuline a été évaluée. Des souris *ApoE* knockout, *ob/ob* et contrôles ont été nourries avec un régime riche en gras. Ces souris déficientes pour l'Apo E et la leptine présentent des taux élevés de cholestérol circulant. Le contenu en cholestérol des îlots de Langerhans ainsi que le GSIS ont été ensuite déterminés. Il en ressort que les taux en cholestérol des îlots étaient augmentés chez les souris *ApoE* knockout et *ob/ob* comparées au souris contrôles. Ces augmentations se sont traduites par une diminution du GSIS **(Figure 40)** (Hao et al., 2007).

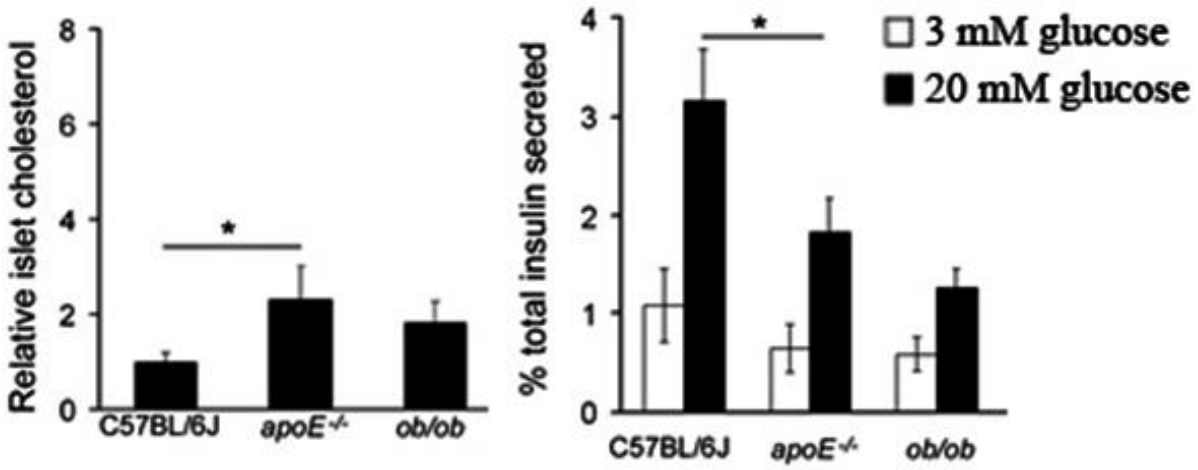


Figure 40 : Impact de l'accumulation de cholestérol sur la sécrétion d'insuline par des souris contrôles, ApoE knockout et ob/ob (extraite et adaptée de Hao et al., 2007). Après un régime riche en gras, le taux de cholestérol était plus élevé dans les îlots de Langerhans des souris ApoE knockout et dans les souris ob/ob (bien que non significatif) comparées aux souris contrôles. La quantité d'insuline sécrétée suite à une stimulation avec 20mM de glucose était diminuée chez les souris ApoE knockout et ob/ob comparées aux souris contrôles.

En 2008, l'équipe du Dr. Shimano a étudié l'influence de SREBP-2 sur la sécrétion d'insuline. Ils ont généré des souris transgéniques sur-exprimant le facteur de transcription SREBP-2 humain. La glycémie à jeun des souris sur-exprimant SREBP-2 était augmentée par rapport aux souris contrôles. Inversement, l'insulinémie était diminuée chez les souris sur-exprimant

SREBP-2. L'analyse morphologique des cellules β pancréatiques a révélé une diminution du nombre et de la taille de ces cellules chez les souris transgéniques sur-exprimant SREBP-2. Le GSIS des îlots de Langerhans des souris SREBP-2 transgéniques était diminué comparé aux souris contrôles. La surexpression de SREBP2 s'est traduite par une surexpression du *LDLR* et une accumulation de cholestérol dans les cellules pancréatiques des souris transgéniques **(Figure 41)**. Cette étude suggère que l'activation de SREBP-2 induirait l'augmentation du LDLR et l'engorgement en cholestérol des cellules β provoquant la diminution de la masse cellulaire et l'altération du GSIS (Ishikawa et al., 2008).

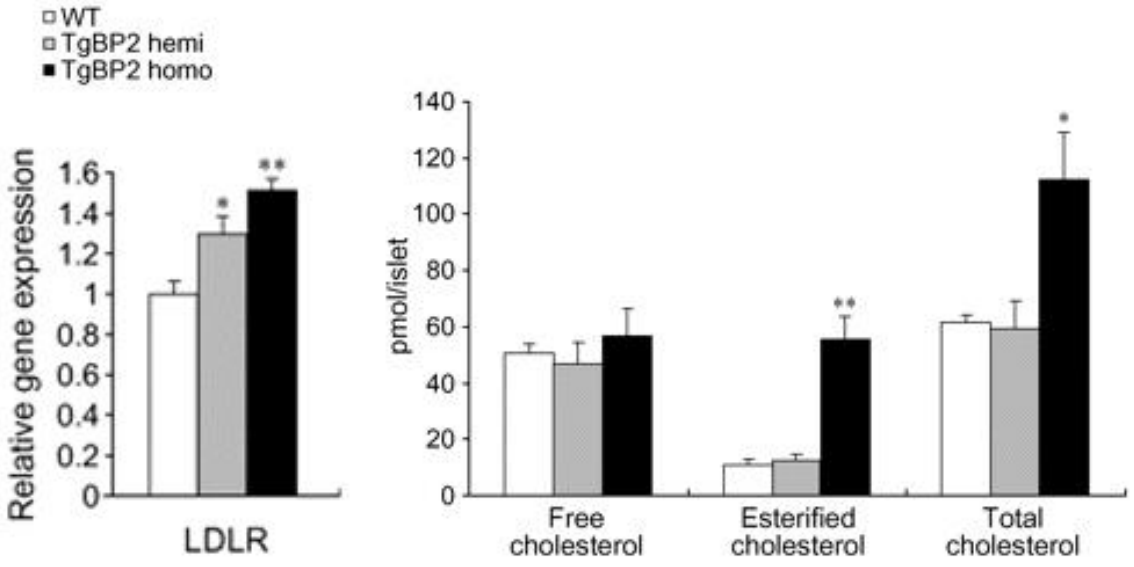


Figure 41 : Expression du LDLR et accumulation de cholestérol dans les souris contrôles et les souris hétéro- homozygotes sur-exprimant SREBP-2 (extraite et adaptée de Ishikawa et al., 2008). La surexpression de SREBP2 chez des souris a induit une surexpression du LDLR et une accumulation de cholestérol dans les cellules du pancréas des souris transgéniques sur-exprimant SREBP-2.

Les statines réduisent les taux de LDL-C en inhibant la synthèse endogène de cholestérol et en augmentant l'expression du LDLR au niveau hépatique mais aussi dans les tissus périphériques. Au niveau du pancréas, la surexpression du LDLR entraînerait une surcharge en cholestérol des

cellules β et une altération du GSIS induisant le DT2. L'effet exact des inhibiteurs de PCSK9 sur le GSIS n'est pas connu à ce jour.

Objectifs de la thèse

Résumé de la littérature **–** Le LDLR constitue la voie métabolique majeure par laquelle le LDL-C circulant est épuré. Cette voie est prépondérante au niveau des hépatocytes. Certaines perturbations de ce métabolisme liées à l'environnement ou à un défaut génétique peuvent conduire à une accumulation anormale de cholestérol dans l'intima de la paroi des artères entrainant l'apparition de maladies cardiovasculaires. Ainsi, la prescription de statines, médicaments hypolipémiants, permet de réduire les taux circulants de LDL-C en augmentant l'expression du LDLR. Le bénéfice sur la réduction des maladies cardiovasculaires est indéniable. Néanmoins, l'utilisation de statines à fortes doses chez les individus prédisposés peut induire l'apparition d'un diabète de type 2. En 2003, PCSK9 a été découvert comme étant un inhibiteur naturel du LDLR. Les mutations GOF de PCSK9 confèrent un phénotype d'hypercholestérolémie familiale et sont associées de façon négative à l'apparition du DT2. Inversement, les mutations LOF de PCSK9 semblent protéger les porteurs de ces mutations contre l'apparition de maladies cardiovasculaires et augmentent le risque de DT2. En raison du rôle que joue PCSK9 dans la régulation du LDL-C circulant, des inhibiteurs de PCSK9 ont été développés. On distingue, notamment, les anticorps monoclonaux dirigés contre PCSK9, Evolocumab (Repatha®, AMGEN) et Alirocumab (Praluent®, SANOFI-REGENERON), qui ont reçu une autorisation de mise sur le marché en 2015. A ce jour, les données de la littérature sont controversées concernant l'incidence du DT2 après un traitement aux inhibiteurs de PCSK9.

Premier objectif **–** PCSK9 est une protéine circulante. La concentration plasmatique moyenne de PCSK9 dans la population générale avoisine 200ng/mL. Le premier objectif de ma thèse a été de déterminer les niveaux plasmatiques de PCSK9 chez des patients diabétiques de type 2 et d'évaluer si un traitement à l'atorvastatine modulait ces niveaux comparativement à un groupe d'individus non diabétiques. Cet objectif a été évalué dans la cohorte Illuminate (Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events).

Deuxième objectif **–** Les résultats du premier objectif ont fait ressortir une augmentation des concentrations plasmatiques de PCSK9 chez les individus diabétiques. Le deuxième objectif de ma thèse a ensuite été d'évaluer si le taux de PCSK9 circulant est un biomarqueur prédictif de la survenue du DT2 chez des individus prédisposés. Pour ce faire, les concentrations plasmatiques en PCSK9 ont été dosées dans un échantillon de 2 100 individus de la cohorte brésilienne en population générale ELSA-Brasil (Etude longitudinales de la santé des adultes) et dans une cohorte de réplication, la cohorte nantaise IT-DIAB (Innovation Thérapeutique Diabète) composée de 303 patients prédiabétiques. Des outils statistiques ont ensuite été utilisés pour déterminer les corrélations entre la concentration plasmatique en PCSK9 et la survenue du DT2 après 4 à 5 ans de suivi.

Troisième objectif **–** Les statines à forte dose induisent l'apparition du DT2 chez les individus prédisposés. Les mécanismes impliqués dans cette conversion vers un état diabétique ne sont pas élucidés. Il existe plusieurs hypothèses concernant les effets pléiotropes des statines notamment sur les cellules β pancréatiques. En effet, au niveau des cellules β, les statines peuvent agir sur la modulation des canaux calciques voltage dépendants, la modulation de la sous-unité Kir6.2 des canaux potassiques ATP dépendants, la production d'ATP sans oublier le captage de LDL-C. D'autre part, après la prise d'une statine, ces cellules β pourraient sur-exprimer leurs LDLR et s'engorger en cholestérol entrainant un dysfonctionnement cellulaire et une altération de la sécrétion d'insuline. Le troisième objectif de ma thèse a été de déterminer les effets du captage de cholestérol dans les cellules β. Ces travaux ont été réalisés en parallèle des travaux du deuxième objectif. Dans un premier temps, j'ai évalué si les cellules β humaines étaient capables d'exprimer et de sécréter PCSK9. Ensuite, j'ai étudié les modulations de l'expression et la fonction du LDLR des cellules β humaines après traitement de ces cellules avec du PCSK9 recombinant, avec de la mévastatine, avec Alirocumab, ou avec des siRNA

dirigés contre PCSK9. Enfin, j'ai investigué la modulation du GSIS avant ou après ces traitements en présence ou non de LDL.

Travaux personnels

1. Valorisation des recherches bibliographiques

Les aspects majeurs de l'inhibition de PCSK9 au-delà de la réduction de LDL

Stéphane Ramin-Mangata, Valentin Blanchard et Gilles Lambert

Publié dans Current Opinion in Lipidology (2018) 29, 453-458

Le rôle de PCSK9 dans la régulation du LDLR est très bien documenté depuis sa découverte en 2003. Néanmoins, son mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé à ce jour. De plus, les effets de PCSK9 au-delà du métabolisme lipidique n'ont été que très peu étudiés. Mon sujet de thèse porte sur l'étude du rôle du LDLR et de PCSK9 dans l'apparition du DT2. Afin de mener à bien mon projet, j'ai réalisé une veille bibliographique concernant les nouvelles découvertes sur PCSK9 et notamment son implication directe ou indirecte dans le DT2. J'ai eu l'opportunité de valoriser ce travail bibliographique par la rédaction d'une revue dans « Current Opinion in Lipidology ». Notre revue est articulée autour de 3 thématiques principales : (i) les nouvelles découvertes concernant le mécanisme d'action de PCSK9, (ii) l'inhibition de PCSK9 et la lipoprotéine (a) et (iii) l'inhibition de PCSK9 et le DT2. La première et la troisième partie sont en lien direct avec mon introduction de thèse. La deuxième partie est en lien avec les travaux menés par Valentin Blanchard.

REVIEW

Key aspects of PCSK9 inhibition beyond LDL lowering

Stéphane Ramin-Mangata, Valentin Blanchard*, and Gilles Lambert*

Purpose of review
Our primary objective is to review the most recent findings on the biology of PCSK9 and on two key aspects of PCSK9 inhibition beyond LDL control of great clinical relevance: the regulation of lipoprotein (a) circulating levels by PCSK9 inhibitors and the putative diabetogenic effects of these novel therapies.

Recent findings
The reality of two distinct extracellular and intracellular pathways by which PCSK9 decreases the abundance of the LDLR at the surface of many cell types, most importantly hepatocytes, has recently been established. In contrast, the exact mechanisms by which PCSK9 inhibitors lower the circulating levels of lipoprotein (a) remain a point of major dispute. Despite strong indications from genetic studies that PCSK9 inhibition should increase diabetes risk, no such effect has been observed in clinical trials, and in-vitro and in-vivo studies do not clarify this issue.

Summary
The trafficking pathways by which PCSK9 enhance LDLR degradation via the endolysosomal extracellular route or via the Golgi–lysosomal intracellular route remain to be fully elucidated. The mechanisms by which PCSK9 inhibitors reduce lipoprotein (a) also merit additional research efforts. The role of PCSK9 on glucose metabolism should likewise be studied in depth.

Keywords
diabetes, LDL receptor, lipoprotein (a), PCSK9

INTRODUCTION

PCSK9 plays a pivotal role in lipoprotein metabolism as a potent inhibitor of the LDL receptor (LDLR). Its precursor undergoes intramolecular autocatalytic cleavage and the resulting heterodimer is routed towards the secretory pathway. PCSK9 binds to the epidermal growth factor precursor homology domain of the LDLR and undergoes endocytosis together with the receptor. The affinity between the LDLR and PCSK9 increases with the acidic conditions found in endosomes, which locks the receptor in an 'open' conformation. The PCSK9/LDLR complex is subsequently degraded in the lysosome, precluding normal recycling of the LDLR to the plasma membrane (Fig. 1).

RECENT INSIGHTS INTO PCSK9 BIOLOGY

PCSK9 gene expression is modulated by SREBP2 and HNF1α transcription factors [1]. E2F1, an importsant transcription factor regulating cell cycle, was recently shown to trans-activate *PCSK9* promoter synergistically with SREBP2 *in vitro* as well as *in vivo*. E2F1 thereby controls LDLR abundance and LDL uptake via a positive regulation of *PCSK9* gene expression [2▪]. In addition, three micro-RNAs were shown to finely tune PCSK9 expression posttranscriptionally [3].

It is well established that PCSK9 targets the LDLR for lysosomal degradation. However, the trafficking of the PCSK9/LDLR complex has not been elucidated yet. The presentation of PCSK9 to the LDLR at the cell surface was recently proposed to be mediated by heparan sulfate proteoglycans [4▪]. As a significant proportion of circulating PCSK9 is bound to LDL and appears as such to be less sensitive to furin cleavage and thereby more active [5], it remains to be seen whether heparan sulfate

Laboratoire Inserm UMR 1188, DéTROI, Université de La Réunion, Sainte-Clotilde, France

Correspondence to Gilles Lambert, PhD, Inserm UMR 1188, Plateforme CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, 97490 Sainte Clotilde, France.
Tel: +33 262 692 437 708; fax: +33 262 262 938 237;
e-mail: gilles.lambert@univ-reunion.fr

*Stéphane Ramin-Mangata and Valentin Blanchard Equal contributions.

Curr Opin Lipidol 2018, 29:453–458
DOI:10.1097/MOL.0000000000000551

0957-9672 Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

KEY POINTS

- Lysosomal degradation of the LDLR induced by PCSK9 occurs via two distinct intracellular and extracellular pathways.
- The physiological mechanisms by which PCSK9 inhibitors, unlike statins, reduce circulating Lp(a) levels remain a point of controversy.
- The possibility raised by genetic studies that PCSK9 inhibition may slightly increase diabetes risk has not been observed in large-scale clinical trials.

proteoglycans also present the LDL/PCSK9 complex to the receptor.

Noticeably, the PCSK9/LDLR complex can reach the lysosome via the extracellular endosome–lysosome route or alternatively via the Golgi–lysosome pathway that requires a direct interaction between the LDLR and PCSK9 intracellularly. The description of one LDLR mutant insensitive to PCSK9-induced degradation via the extracellular but not via the intracellular route illustrates major differences between both pathways in terms of trafficking dynamics [6]. The extracellular pathway appears to be favored in the liver, since grp94, an endoplasmic reticulum resident protein expressed in this tissue prevents PCSK9 from interacting with the LDLR [7]. In addition, grp74 prevents a direct interaction between PCSK9 loss-of-function variants that are retained in the endoplasmic reticulum (ER) and grp78, a chaperone known to activate ER stress transducers. As a result, these variants do not induce unfolded protein response or apoptosis, as it is the case with numerous mutant proteins retained in the ER [8,9▪]. Even if some PCSK9 variants display altered intracellular trafficking [8], the dynamics of PCSK9 exit from the ER to the Golgi and beyond still remain elusive.

In that respect, PCSK9 gain-of-function variants work by heterogenous mechanisms that all result in enhanced degradation of the LDLR, and promote hypercholesterolemia. For instance, mutations located in its 5′UTR may increase *PCSK9* gene expression. Mutations located within the PCSK9 pro-domain usually enhance the intracellular or the extracellular LDLR degradation pathways. Mutations located within the catalytic and the C-terminal domains of PCSK9 can reduce furin-mediated cleavage or increase the binding affinity of PCSK9 for the LDLR [10,11▪]. Similarly, heterogeneous are PCSK9 loss-of-function variants that all reduce the degradation of the LDLR and thereby promote hypocholesterolemia. These mutants may be not produced (e.g. premature stop codons), retained in the ER and poorly secreted, they may present with reduced affinities for the LDLR or an enhanced ability to be inactivated by furin [11▪,12].

From a clinical perspective, the exact mechanisms by which PCSK9 enhance LDLR degradation clearly merit to be elucidated, as they might provide

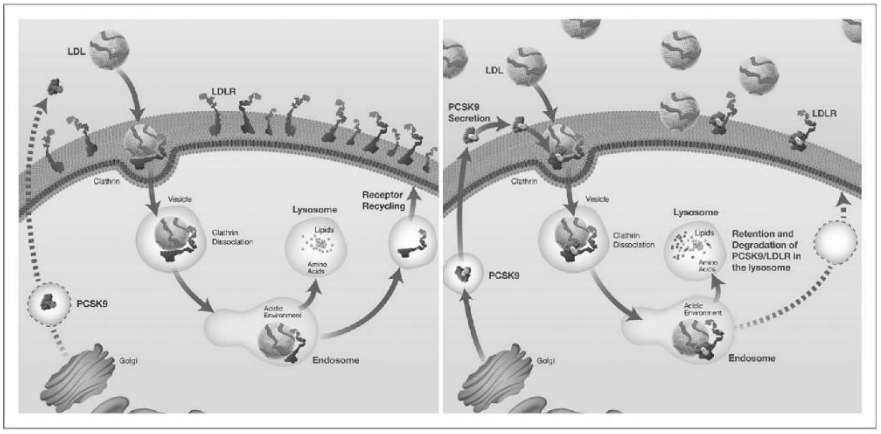


FIGURE 1. The biology of PCSK9. In the absence of PCSK9, the acidic environment of the endosome releases the LDLR from the LDL particle, and the receptor is recycled to the cell surface whereas the LDL particle is routed to the lysosome (left panel). When bound to PCSK9, the LDLR traffics to the lysosomal compartment and is degraded along with the LDL particle (right panel).

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

important information regarding potential adverse effects in particular for drugs targeting PCSK9 intracellularly.

PCSK9 INHIBITION AND LIPOPROTEIN (A): IN-VITRO STUDIES

Given that statins do not lower lipoprotein (a) [Lp(a)] [13], it had not been anticipated that PCSK9 inhibitors that also increase the abundance of the LDLR would significantly reduce Lp(a) levels [14]. Lp(a) is a highly atherogenic lipoprotein made of a unique protein structurally similar to plasminogen, apolipoprotein (a) [apo(a)], covalently linked to the apoB100 moiety of an LDL particle [15▪▪]. Elevated Lp(a) is the single most common genetically inherited risk factor for coronary heart disease. It is causative of calcific aortic valve stenosis. Whereas circulating Lp(a) levels are primarily determined genetically, the molecular mechanisms by which PCSK9 inhibitors reduce Lp(a) have not been clearly established and remain a point of controversy [14,16].

In-vitro experiments have provided conflicting evidence regarding the role of the LDLR in Lp(a) cellular uptake. Thus, PCSK9 was shown to reduce the binding and the cellular uptake of Lp(a) via the LDLR in human hepatoma cells, in primary human fibroblasts, and in primary murine hepatocytes, whereas the LDLR-related protein 1 (LRP1) was ruled out as a putative receptor for Lp(a) [17–19]. In another study, the LDLR did not seem to play any significant role in mediating Lp(a) cellular uptake in primary human hepatocytes, in primary human fibroblasts, as well as in human hepatoma cells [14,20,21]. Neither did we observe any significant difference in Lp(a) cellular uptake in primary lymphocytes isolated from controls and homozygous familial hypercholesterolemia patients who totally lack LDLR function (G. Lambert, unpublished observation). Other receptors have been proposed to mediate Lp(a) hepatic uptake, including the scavenger receptor BI (SR-BI), and the plasminogen receptor PlgRKT [20]. In that study conducted in hepatoma cells, Lp(a) is taken up by the plasminogen receptor PlgRKT, and apo(a) is to some extent re-secreted.

PCSK9 INHIBITION AND LIPOPROTEIN (A): IN-VIVO STUDIES

In-vivo experiments have also provided conflicting evidence regarding the role of the LDLR and the effects of PCSK9 inhibitors on Lp(a) turnover, production and catabolism. Thus, PCSK9 inhibition with alirocumab increased, although not significantly, the fractional catabolic rate of Lp(a) in human volunteers [22]. In contrast, PCSK9 neutralization with evolocumab in monotherapy did not alter the fractional catabolic rate but rather enhanced the production rate of Lp(a) in another human study [23▪]. Discrepancies between these studies in terms of Lp(a) kinetic parameters might stem from the facts that the degree of Lp(a) reduction induced by PCSK9 inhibitors substantially differed (−19 vs. −35%, respectively), and that the demographical characteristics of the patients were quite different (mixed race and sex vs. caucasian men only, respectively) [22,24]. On top of statin treatment, however, evolocumab enhanced the catabolism of Lp(a) [23▪]. In addition, alirocumab was recently shown in nonhuman primates to efficiently reduce apolipoprotein B100 primarily by enhancing its catabolism and apolipoprotein (a) primarily by lowering its production [25▪], an observation in line with a previous study in which PCSK9 enhanced apo(a) secretion from human primary hepatocytes [21].

The studies mentioned above have not provided a consensus regarding the mechanism(s) governing Lp(a) clearance. In favor of a role of the LDLR in mediating Lp(a) clearance: familial hypercholesterolemia patients presenting with LDLR defects usually display higher Lp(a) level than their nonaffected relatives, the correlations between changes in LDL (−50/60%) and changes in Lp(a) (−20/30%) following PCSK9 inhibitors treatments are weak but consistently significant [5,25▪,26] and appear independent of apo(a) polymorphisms [27]. In favor of a non-LDLR mediated pathway: PCSK9 inhibitors lower Lp(a) even in receptor-negative homozygous familial hypercholesterolemia patients without modulating LDL-C, up-regulating the LDLR even in the most potent statins does not reduce Lp(a), there is no correlation between the levels of LDLR expression assessed *ex vivo* and the levels of circulating Lp(a) in familial hypercholesterolemia patients [13,28▪]. More work is, therefore, required to elucidate the exact mechanisms governing Lp(a) production and clearance and their modulation by PCSK9 and PCSK9 inhibitors.

From a clinical point of view, it has not been established whether the reduction in Lp(a) induced by PCSK9 inhibitors *per se* confers cardiovascular protection. Clinical trials with evolocumab or alirocumab have not shown any incremental benefits in terms of cardiovascular risk (CVD) risk reduction compared with what would have been anticipated from the sole reduction in LDL-C induced by these drugs [29,30]. Nevertheless, it has recently been shown that patients with high baseline Lp(a) levels benefit more from these treatments in terms of absolute cardiovascular risk reduction than patients with low-baseline Lp(a) levels (Dr M O'Donoghue

0957-9672 Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

presentation at EAS meeting 2018 and Dr V Bittner presentation at ISA meeting 2018).

PCSK9 INHIBITION AND DIABETES: EPIDEMIOLOGICAL STUDIES

Despite their undisputable beneficial effects in lowering LDL-C and CVD risk, statins have shown to slightly but significantly increase the risk of new-onset diabetes among predisposed individuals. As both statins and PCSK9 inhibitors reduce LDL-C by increasing the abundance of the LDLR at the surface of many cell types, most importantly hepatocytes, a very logical question is to determine whether PCSK9 inhibitors might also increase the risk of diabetes. Whereas enhancing the LDLR pathway in the liver is antiatherogenic and clearly beneficial, activating the same pathway in pancreatic β-cells may lead to LDL cholesterol overload and be harmful to those cells. This hypothesis is underpinned by Mendelian randomization studies showing that genetic variants in *HMGCR* and *PCSK9* that confer lifelong reductions in LDL-C levels and are thus cardioprotective, also additively associate with an increased risk of developing diabetes [31–33]. Further advocating for a role of the LDLR in the development of diabetes, the observation that diabetes prevalence is twice lower in patients with familial hypercholesterolemia compared with their nonaffected relatives (1.75 vs. 2.93%, respectively) [34]. Diabetes risk was further reduced in carriers of the most severe mutations (i.e. negative vs. defective *LDLR* genetic defects at 1.41 vs. 1.80%, respectively), but also in carriers of familial hypercholesterolemia causing *APOB* mutations (at 2.42%) [34].

PCSK9 INHIBITION AND DIABETES: PRECLINICAL STUDIES

The LDLR is expressed abundantly at the surface of pancreatic β-cells where it promotes LDL uptake [35▪]. However, β-cell lines exposed to LDL in culture often display increased necrosis or apoptosis as well as reduced insulin secretion ability in response to glucose, indicating that excessive uptake of LDL cholesterol could be detrimental to β-cells [36,37]. Fully in line with its role in most tissues, PCSK9 is involved in the regulation of the LDLR in pancreatic islets. Thus, islet cells from PCSK9 knockout mice show increased LDLR expression, whereas human islets incubated with recombinant PCSK9 display reduced LDLR expression levels [38]. Experiments conducted in rodents have, however, yielded opposite conclusions about the effect of PCSK9-deficiency on glucose homeostasis. There was no alteration in glucose homeostasis in PCSK9 knockout mice, including glucose-stimulated insulin secretion measured in one study [38], whereas another study showed that PCSK9 knockout male mice are glucose intolerant, with an increased rate of β-cell apoptosis [39]. In a more recent study, PCSK9 knockout mice were shown to present with glucose intolerance without any sign of insulin resistance [35▪]. The secretion of insulin appeared impaired in PCSK9 knockout mice, an effect associated with an increased presence of islets of large sizes, and dependent on the presence of a functional LDLR. In contrast, liver-specific PCSK9-knockout mice, a model in which there is no detectable circulating PCSK9, have normal pancreatic LDLR expression and do not show any sign of glucose intolerance [35▪]. In mice, PCSK9 was found to be expressed in Langherans islets δ-cells and proposed to contribute to the limitation of cholesterol overload in neighbouring β-cells [35▪,38]. In humans, however, *PCSK9* gene expression appears to occur preferentially in β-cells (Fig. 2). Beyond its role on β-cell function, the role of PCSK9 on insulin sensitivity remains largely unknown. In epidemiological studies, plasma PCSK9 concentrations have been found to be positively correlated with the index of insulin resistance HOMA-IR.

From a clinical point of view, the possibility that PCSK9 inhibition may slightly increase the risk of new onset diabetes is supported by some pathophysiological and genetic studies. However, PCSK9 inhibition did not increase the risk of diabetes in large-scale clinical trials [40▪].

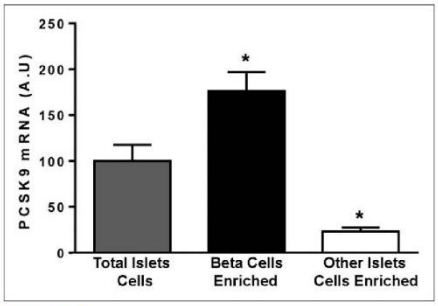


FIGURE 2. *PCSK9* gene is expressed in sorted human β-cells – human pancreatic islets were isolated from nondiabetic donors and pancreatic β-cells were sorted by flow cytometry. PCSK9 mRNA expression was measured by multiplexed hybridization and normalized to a panel of five housekeeping genes. Data represent the mean ± SEM of at least three independent experiments. $^{*}P < 0.05$ vs. total islets cells. SEM, standard error of mean.

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

CONCLUSION

The successful developments of evolocumab and alirocumab unambiguously demonstrate that PCSK9 is an extremely valuable therapeutic target, given that these novel therapies clearly improve clinical outcomes with extremely limited side effects. The cellular trafficking pathways by which PCSK9 enhance LDLR degradation either via the endolysosomal extracellular route or via the Golgi-lysosomal intracellular route still need to be elucidated. Likewise, the mechanisms by which PCSK9 inhibitors reduce lipoprotein (a) remain a point of controversy and certainly merit additional research efforts. Additional work on the putative role of PCSK9 in the overall metabolism of glucose are also needed, given the paucity of data from long-term follow-up studies with PCSK9 inhibitors. No doubt that these gaps in knowledge will be filled in the coming years.

Acknowledgements

We deeply thank Dr Raphaël Scharfmann who shared the information that PCSK9 mRNA is expressed in sorted human beta-cells.

Financial support and sponsorship

This work was supported by the French national project CHOPIN (CHolesterol Personalized Innovation) granted by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-RHUS-0007).

Conflicts of interest

G.L. has received research funding and honoraria from Sanofi, Regeneron, Amgen, Affiris, Pfizer, and Nyrada Inc.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:
■ of special interest
■■ of outstanding interest

1. Seidah NG, Chrétien M, Mbikay M. The ever-expanding saga of the proprotein convertases and their roles in body homeostasis: emphasis on novel proprotein convertase subtilisin kexin number 9 functions and regulation. Curr Opin Lipidol 2018; 29:144–150.
2. ■ Lai O, Giralt A, Le May C, *et al.* E2F1 inhibits circulating cholesterol clearance by regulating Pcsk9 expression in the liver. JCI Insight 2017; 2:. doi: 10.1172/jci.insight.89729.

An elegant study showing that the transcription factor E2F1 maintains cellular cholesterol homeostasis through the positive regulation of *PCSK9* gene expression.

3. Naeli P, Mirzadeh Azad F, Malakootian M, *et al.* Posttranscriptional Regulation of PCSK9 by miR-191, miR-222, and miR-224. Front Genet 2017; 8:189.
4. ■ Gustafsen C, Olsen D, Vilstrup J, *et al.* Heparan sulfate proteoglycans present PCSK9 to the LDL receptor. Nat Commun 2017; 8:503.

A provocative demonstration that the N terminal domain of PCSK9 contains a cluster of basic residues that interact with HSPGs, which is essential for PCSK9 function *in vitro* and *in vivo*.

5. Shapiro MD, Tavori H, Fazio S. PCSK9: from basic science discoveries to clinical trials. Circ Res 2018; 122:1420–1438.
6. Susan-Resiga D, Girard E, Kiss RS, *et al.* The proprotein convertase subtilisin/kexin type 9-resistant R410S low density lipoprotein receptor mutation: a novel mechanism causing familial hypercholesterolemia. J Biol Chem 2017; 292:1573–1590.
7. Poirier S, Mamarbachi M, Chen W-T, *et al.* GRP94 regulates circulating cholesterol levels through blockade of PCSK9-induced LDLR degradation. Cell Rep 2015; 13:2064–2071.
8. Poirier S, Hamouda HA, Villeneuve L, *et al.* Trafficking dynamics of PCSK9-induced LDLR degradation: focus on human PCSK9 mutations and C-terminal domain. PloS One 2016; 11:e0157230.
9. ■ Lebeau P, Platko K, Al-Hashimi AA, *et al.* Loss-of-function PCSK9 mutants evade the unfolded protein response sensor GRP78 and fail to induce endoplasmic reticulum stress when retained. J Biol Chem 2018; 293:7329–7343.

An elegant study showing that the PCSK9-Q152H loss of function variant retained in the ER does not cause ER stress as it is efficiently degraded in the proteasome.

10. Di Taranto MD, Benito-Vicente A, Giacobbe C, *et al.* Identification and in vitro characterization of two new PCSK9 gain of function variants found in patients with familial hypercholesterolemia. Sci Rep 2017; 7:15282.
11. ■ Dron JS, Hegele RA. Complexity of mechanisms among human proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 variants. Curr Opin Lipidol 2017; 28: 161–169.

A comprehensive review on the mode of action of PCSK9 gain-of-function and PCSK9 loss of-function mutants

12. Chorba JS, Galvan AM, Shokat KM. Stepwise processing analyses of the single-turnover PCSK9 protease reveal its substrate sequence specificity and link clinical genotype to lipid phenotype. J Biol Chem 2018; 293:1875–1886.
13. Arsenault BJ, Petrides F, Tabet F, *et al.* Effect of atorvastatin, cholesterol ester transfer protein inhibition, and diabetes mellitus on circulating proprotein subtilisin kexin type 9 and lipoprotein(a) levels in patients at high cardiovascular risk. J Clin Lipidol 2018; 12:130–136.
14. Lambert G, Thedrez A, Croyal M, *et al.* The complexity of lipoprotein (a) lowering by PCSK9 monoclonal antibodies. Clin Sci (Lond) 2017; 131:261–268.
15. ■■ Tsimikas S, Fazio S, Ferdinand KC, *et al.* NHLBI Working Group recommendations to reduce lipoprotein(a)-mediated risk of cardiovascular disease and aortic stenosis. J Am Coll Cardiol 2018; 71:177–192.

An excellent expert recommendation article on lipoprotein(a) listing the main gaps in knowledge on this understudied lipoprotein.

16. Boffa MB, Koschinsky ML. The journey towards understanding lipoprotein(a) and cardiovascular disease risk: are we there yet? Curr Opin Lipidol 2018; 29:259–267.
17. Romagnuolo R, Scipione CA, Marcovina SM, *et al.* Roles of the low density lipoprotein receptor and related receptors in inhibition of lipoprotein(a) internalization by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. PloS One 2017; 12:e0180869.
18. Raal FJ, Giugliano RP, Sabatine MS, *et al.* PCSK9 inhibition-mediated reduction in Lp(a) with evolocumab: an analysis of 10 clinical trials and the LDL receptor's role. J Lipid Res 2016; 57:1086–1096.
19. Romagnuolo R, Scipione CA, Boffa MB, *et al.* Lipoprotein(a) catabolism is regulated by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 through the low density lipoprotein receptor. J Biol Chem 2015; 290:11649–11662.
20. Sharma M, Redpath GM, Williams MJA, McCormick SPA. Recycling of apolipoprotein(a) after PIgRKT-mediated endocytosis of lipoprotein(a). Circ Res 2017; 120:1091–1102.
21. Villard EF, Thedrez A, Blankenstein J, *et al.* PCSK9 modulates the secretion but not the cellular uptake of lipoprotein(a) ex vivo: an effect blunted by alirocumab. JACC Basic Transl Sci 2016; 1:419–427.
22. Reyes-Soffer G, Pavlyha M, Ngai C, *et al.* Effects of PCSK9 inhibition with alirocumab on lipoprotein metabolism in healthy humans. Circulation 2017; 135:352–362.
23. ■ Watts GF, Chan DC, Somaratne R, *et al.* Controlled study of the effect of proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 inhibition with evolocumab on lipoprotein(a) particle kinetics. Eur Heart J 2018; 39:2577–2585.

A rigorous demonstration showing how PCSK9 inhibition reduces Lp(a) by a series of in-vivo human kinetic studies.

24. Watts GF, Chan DC, Dent R, *et al.* Factorial effects of evolocumab and atorvastatin on lipoprotein metabolism. Circulation 2017; 135:338–351.
25. ■ Croyal M, Tran T-T-T, Blanchard RH, *et al.* PCSK9 inhibition with alirocumab reduces lipoprotein(a) levels in nonhuman primates by lowering apolipoprotein(a) production rate. Clin Sci (Lond) 2018; 132:1075–1083.

This cross over study demonstrates that the PCSK9 inhibitor alirocumab reduces Lp(a) production and augments LDL catabolism *in vivo*.

26. Edmiston JB, Brooks N, Tavori H, *et al.* Discordant response of low-density lipoprotein cholesterol and lipoprotein(a) levels to monoclonal antibodies targeting proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. J Clin Lipidol 2017; 11:667–673.
27. Enkhmaa B, Anuurad E, Zhang W, *et al.* The roles of apo(a) size, phenotype, and dominance pattern in PCSK9-inhibition-induced reduction in Lp(a) with alirocumab. J Lipid Res 2017; 58:2008–2016.
28. ■ Thedrez A, Blom DJ, Ramin-Mangata S, *et al.* Homozygous familial hypercholesterolemia patients with identical mutations variably express the LDLR (low-density lipoprotein receptor): implications for the efficacy of evolocumab. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2018; 38:592–598.

A comprehensive study showing that residual LDLR activity is key for PCSK9i-mediated reductions in LDL-C among homozygote familial hypercholesterolemia.

29. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, *et al.* Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease. N Engl J Med 2017; 376:1713–1722.

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

30. Ridker PM, Revkin J, Amarenco P, *et al.*, SPIRE Cardiovascular Outcome Investigators. Cardiovascular efficacy and safety of bococizumab in high-risk patients. N Engl J Med 2017; 376:1527–1539.

31. Lotta LA, Sharp SJ, Burgess S, *et al.* Association between low-density lipoprotein cholesterol-lowering genetic variants and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis. JAMA 2016; 316:1383–1391.

32. Schmidt AF, Swerdlow DI, Holmes MV, *et al.* PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a Mendelian randomisation study. Lancet Diabetes Endocrinol 2017; 5:97–105.

33. Ference BA, Robinson JG, Brook RD, *et al.* Variation in PCSK9 and HMGCR and risk of cardiovascular disease and diabetes. N Engl J Med 2016; 375:2144–2153.

34. Besseling J, Kastelein JJP, Defesche JC, *et al.* Association between familial hypercholesterolemia and prevalence of type 2 diabetes mellitus. JAMA 2015; 313:1029–1036.

35. Da Dalt L, Ruscica M, Bonacina F, *et al.* PCSK9 deficiency reduces insulin ▪ secretion and promotes glucose intolerance: the role of the low-density lipoprotein receptor. Eur Heart J 2018. doi: 10.1093/eurheartj/ehy357.
An elegant study showing that PCSK9 deficiency in mouse models causes impairment in glucose homeostasis as a result of defective pancreatic islets.

36. Roehrich M-E, Mooser V, Lenain V, *et al.* Insulin-secreting beta-cell dysfunction induced by human lipoproteins. J Biol Chem 2003; 278: 18368–18375.

37. Cnop M, Hannaert JC, Grupping AY, Pipeleers DG. Low density lipoprotein can cause death of islet beta-cells by its cellular uptake and oxidative modification. Endocrinology 2002; 143:3449–3453.

38. Langhi C, Le May C, Gmyr V, *et al.* PCSK9 is expressed in pancreatic delta-cells and does not alter insulin secretion. Biochem Biophys Res Commun 2009; 390:1288–1293.

39. Mbikay M, Sirois F, Mayne J, *et al.* PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities. FEBS Lett 2010; 584:701–706.

40. Sabatine MS, Leiter LA, Wiviott SD, *et al.* Cardiovascular safety and ▪ efficacy of the PCSK9 inhibitor evolocumab in patients with and without diabetes and the effect of evolocumab on glycaemia and risk of new-onset diabetes: a prespecified analysis of the FOURIER randomised controlled trial. Lancet Diabetes Endocrinol 2017; 5: 941–950.
This study demonstrates that the PCSK9 inhibitor evolocumab does not worsen diabetes or cause new onset diabetes.

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

2. Premier article

L'effet de l'atorvastatine, de l'inhibition de la CETP et du diabète de type 2 sur les niveaux plasmatiques de PCSK9 et de Lp(a) chez les patients à haut risque cardiovasculaire

Benoit J. Arsenault, Francine Petrides, Fatiha Tabet, Weihang Bao, Kees Hovingh, Matthijs Boekholdt, **Stéphane Ramin-Mangata**, Olivier Meilhac, David Demicco, Kerry-Anne Rye, David D. Waters, John J. P. Kastelein, Philip Barter, Gilles Lambert

Publié dans Journal of Clinical Lipidology (2018) 12, 130-136

Introduction – PCSK9 est une protéine sécrétée majoritairement par les hépatocytes et impliquée dans la régulation du LDLR. Ainsi, des dosages biochimiques ont été mis au point afin de déterminer sa concentration plasmatique. Les premiers dosages réalisés sur 72 volontaires présentaient une grande variabilité des concentrations qui allaient de 50ng/mL à 600ng/mL (Lagace et al., 2006). Dans une autre étude chez 55 donneurs sains, les dosages de PCSK9 plasmatiques étaient compris entre 11ng/mL et 115ng/mL. Dans une population de 115 patients diabétiques, les concentrations de PCSK9 variaient de 100ng/mL à 9 300ng/mL (Alborn et al., 2007; Lambert et al., 2008). Les dosages biochimiques de PCSK9 chez les individus diabétiques de type 2 et les non diabétiques étaient tous différents. Ils ont été réalisés par des équipes distinctes avec des approches expérimentales différentes. Il apparaissait donc essentiel de comparer les niveaux de PCSK9 plasmatique entre une population de patients diabétiques et une population d'individus non diabétiques de façon homogène.

La cohorte ILLUMINATE (The Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events) a inclu 15 067 patients à haut risque cardiovasculaire ayant fait un infarctus du myocarde, un AVC, une angine de poitrine ou un DT2 selon les recommandations de l'ADA documenté.

Mon rôle a été de déterminer par ELISA si les taux circulants de PCSK9 étaient différents entre des patients diabétiques et non diabétiques sous différentes doses de statine, dans un sous-groupe de la cohorte Illuminate comprenant 1 745 patients dont 48% diabétiques de type 2. Il s'agit de la première étude établissant clairement un comparatif des concentrations plasmatiques de PCSK9 entre non-diabétiques et diabétiques de type 2.

Journal of Clinical Lipidology (2018) 12, 130–136

Journal of Clinical Lipidology

Effect of atorvastatin, cholesterol ester transfer protein inhibition, and diabetes mellitus on circulating proprotein subtilisin kexin type 9 and lipoprotein(a) levels in patients at high cardiovascular risk

Benoit J. Arsenault, PhD[1], Francine Petrides, PhD[1], Fatiha Tabet, PhD[1], Weihang Bao, PhD, G. Kees Hovingh, MD, PhD, S. Matthijs Boekholdt, MD, PhD, Stéphane Ramin-Mangata, BSc, Olivier Meilhac, PhD, David DeMicco, PharmD, Kerry-Anne Rye, PhD, David D. Waters, MD, John J. P. Kastelein, MD, PhD, Philip Barter, MD, PhD, Gilles Lambert, PhD*

Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Québec, Québec, Canada (Dr Arsenault); Department of Medicine, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, Québec, Canada (Dr Arsenault); School of Medical Sciences, The University of New South Wales, Sydney, New South Wales, Australia (Drs Petrides, Tabet, Rye, and Barter); Pfizer Inc, New York, NY, USA (Drs Bao and DeMicco); Department of Vascular Medicine, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands (Drs Hovingh and Kastelein); Department of Cardiology, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands (Dr Boekholdt); Inserm, UMR 1188 DéTROI, Université de La Réunion, Sainte–Clotilde, France (Drs Ramin-Mangata, Meilhac, and Lambert); and Division of Cardiology, University of California, San Francisco, CA, USA (Dr Waters)

KEYWORDS:
Atorvastatin;
Diabetes mellitus;
Lipoprotein(a);
PCSK9;
CETP

BACKGROUND: Proprotein subtilisin kexin type 9 (PCSK9) and lipoprotein (a) [Lp(a)] levels are causative risk factors for coronary heart disease.

OBJECTIVES: The objective of the study was to determine the impact of lipid-lowering treatments on circulating PCSK9 and Lp(a).

METHODS: We measured PCSK9 and Lp(a) levels in plasma samples from Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events trial patients with coronary heart disease and/or type II diabetes (T2D) mellitus. Patients received atorvastatin, which was titrated (10, 20, 40, or 80 mg/d) to achieve low-density lipoprotein cholesterol levels <100 mg/dL (baseline) and were subsequently randomized either to atorvastatin + torcetrapib, a cholesterol ester transfer protein inhibitor, or to atorvastatin + placebo.

Clinical Trial Registration: NCT00134264.

[1] These authors are considered as first equal authors.

* Corresponding author. Inserm UMR 1188, Plateforme CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, 97490 Sainte Clotilde, France.

E-mail address: gilles.lambert@univ-reunion.fr

Submitted April 11, 2017. Accepted for publication October 3, 2017.

1933-2874/© 2017 National Lipid Association. All rights reserved.

https://doi.org/10.1016/j.jacl.2017.10.001

RESULTS: At baseline, both plasma PCSK9 and Lp(a) were dose-dependently increased with increasing atorvastatin doses. Compared with patients without T2D, those with T2D had higher PCSK9 (357 ± 123 vs 338 ± 115 ng/mL, $P = .0012$) and lower Lp(a) levels (28 ± 32 vs 32 ± 33 mg/dL, $P = .0005$). Plasma PCSK9 levels significantly increased in patients treated with torcetrapib (+13.1 ± 125.3 ng/mL [+3.7%], $P = .005$), but not in patients treated with placebo (+2.6 ± 127.9 ng/mL [+0.7%], $P = .39$). Plasma Lp(a) levels significantly decreased in patients treated with torcetrapib (−3.4 ± 10.7 mg/dL [−11.1%], $P < .0001$), but not in patients treated with placebo (+0.3 ± 9.4 mg/dL [+0.1%], $P = .92$).

CONCLUSION: In patients at high cardiovascular disease risk, PCSK9 and Lp(a) are positively and dose-dependently correlated with atorvastatin dosage, whereas the presence of T2D is associated with higher PCSK9 but lower Lp(a) levels. Cholesterol ester transfer protein inhibition with torcetrapib slightly increases PCSK9 levels and decreases Lp(a) levels.

© 2017 National Lipid Association. All rights reserved.

Introduction

Statin therapy decreases low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels and thereby reduces cardiovascular disease (CVD) risk.[1] By inhibiting intracellular cholesterol synthesis, statins increase the expression of the LDL receptor (LDLR), thus promoting an enhanced clearance of LDL particles. However, statins also increase the expression of proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9), a natural circulating inhibitor of the LDLR.[2] PCSK9 binds to the LDLR and after endocytosis targets the LDLR that normally recycles back to the cell surface, for lysosomal degradation. The efficacy of statins in reducing LDL cholesterol levels appears to be partially offset by a concomitant rise in PCSK9.[3,4] Pharmacologic inhibition of PCSK9 with monoclonal antibodies lowers circulating LDL cholesterol further in patients at high CVD risk and not at LDL cholesterol therapeutic goals despite aggressive statin treatment.[5,6] It is therefore important to determine whether and to what extent statins dose-dependently increase circulating PCSK9 levels in such patients.

In contrast to statins, anti-PCSK9 monoclonal antibodies promote an unexplained 25% to 30% reduction in circulating lipoprotein (a) [Lp(a)] levels.[7] Lp(a) is a lipoprotein subfraction analogous to LDL, where a unique protein homologous to plasminogen, apolipoprotein (a) [apo(a)], is covalently tethered to apolipoprotein B100 by a unique disulfide bond.[8] Approximately 20% of the Caucasian population have high Lp(a) levels (above 50 mg/dL)[9] and a consequent increased risk of coronary heart disease, stroke, calcific aortic valve stenosis, and heart failure.[10–13] The molecular mechanisms of Lp(a) assembly that likely occurs at the surface of hepatocytes between a newly synthesized apo(a) and apoB100 containing lipoproteins (LpB) remain elusive.[14] Apo(a) is never found associated with triglyceride-rich lipoproteins but rather on cholesterol-rich LDL particles.[15,16] The impact of statin therapy on plasma Lp(a) levels is somewhat controversial with studies documenting slight decreases in Lp(a) while others suggest that statins actually increase Lp(a) levels as well as the amount of oxidized phospholipids carried by Lp(a).[17] Similar to PCSK9, whether statins dose-dependently influence Lp(a) plasma levels and whether this could be dependent on metabolic disturbances is unknown.

To shed light on the metabolic states favoring Lp(a) assembly, and thus elevated Lp(a) levels, in conjunction with the ongoing development of PCSK9 inhibitors, we aimed to determine the impact of different doses of statins, with and without metabolic disturbances of triglyceride-rich lipoproteins (eg, in type II diabetes [T2D]) and with and without modulation of their cholesterol content (eg, by inhibition of the cholesterol ester transfer protein [CETP]) on circulating PCSK9 and Lp(a) levels in patients at high cardiovascular risk.

Methods

Study design

The Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events (ILLUMINATE) trial included 15,067 men and women at high cardiovascular risk (Trial Registration Number: NCT00134264). The details of the study population have been previously described.[18] Briefly, men and women aged 45 to 75 years were eligible if they had a prior history of myocardial infarction, stroke, acute coronary syndrome, unstable angina, peripheral vascular disease, or cardiac revascularization within the period of 30 days to 5 years before screening. Patients with T2D who met American Diabetes Association criteria or who were currently on hypoglycemic agents were also eligible. During a run-in period of 4 to 10 weeks, patients received atorvastatin, which was titrated (if needed) at 2-week intervals to achieve LDL cholesterol levels <100 mg/dL with atorvastatin 10, 20, 40, or 80 mg/d. Patients whose LDL cholesterol level met the target were randomly assigned to receive either atorvastatin (at a dose established during the run-in period) plus 60 mg of torcetrapib or atorvastatin

plus placebo. Noteworthy, the use of torcetrapib in ILLUMINATE was found to have serious adverse off-target effects with an increase in cardiovascular events and related deaths.[18] We randomly selected 594 patients receiving torcetrapib and atorvastatin matched in a 1:2 ratio to 1151 patients receiving placebo and atorvastatin. This subset of patients was selected to ensure patients with T2D were overrepresented (48%) and that all atorvastatin doses (10, 20, 40, and 80 mg/d) were also equally represented.

Laboratory analyses

The level of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol was determined through enzymatic analyses with dextran sulfate, polyethylene glycol–modified cholesterol esterase, and cholesterol oxidase, to generate a peroxide that was measured colorimetrically. Total cholesterol and triglyceride levels were determined by standard enzymatic techniques. LDL cholesterol was quantified by the Friedewald formula, except when the triglyceride level was above 400 mg/dL, in which case LDL cholesterol levels were measured by direct beta quantification. Lp(a) was measured by immunoturbidimetry (Randox, Parramata, Australia) and PCSK9 measured by enzyme-linked immunosorbent assay (Cyclex, Nagano, Japan). Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated as follows: glucose (mg/dL) $\times$ insulin (pmol/L) $\div$ 7.175 $\times$ 405.

Statistical analyses

Comparisons of continuous variables were conducted using the 2-sided Wilcoxon rank-sum test. A chi-square test was used to compare categorical variables. Signed-rank tests were used to compare baseline and 3-month PCSK9 and Lp(a) levels.

Results

Plasma PCSK9 and Lp(a) levels were measured at baseline (at the end of the run-in period) and 3 months after randomization in a subset of 594 patients receiving torcetrapib and atorvastatin and in 1151 patients receiving placebo and atorvastatin. The characteristics of the study participants at baseline are presented in Table 1.

At baseline, that is, after the run-in period, both plasma PCSK9 (Fig. 1) and Lp(a) levels (Fig. 2) were dose-dependently elevated with increasing atorvastatin doses. Compared with patients without T2D, those with T2D at baseline had higher PCSK9 (357 $\pm$ 123 vs 338 $\pm$ 115 ng/mL, P = .0012) and lower Lp(a) levels (28 $\pm$ 32 vs 32 $\pm$ 33 mg/dL, P = .0005). Regardless of T2D status, higher atorvastatin doses were associated with higher PCSK9 levels (Fig. 1). Similar to PCSK9 levels, higher atorvastatin doses were associated with higher Lp(a) levels (Fig. 2). Spearman correlation coefficients between PCSK9 and Lp(a) levels with parameters of lipid metabolism and glucose homeostasis are presented in Table 2. Despite statin therapy, which increases PCSK9[3,4] and reduces total and LDL cholesterol levels, circulating PCSK9 levels were positively associated with total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, and apoB as well as with HDL cholesterol and apoA-I levels, albeit to a lower extent. Plasma PCSK9 levels were also positively associated with fasting blood glucose, insulin, and HOMA-IR. Circulating Lp(a) levels were positively

Table 1 Baseline characteristics of study participants classified on the basis of treatment group

	Atorvastatin and placebo, N = 1151	Atorvastatin and torcetrapib, N = 594	*P* value
Male gender, %	83	85	.24
Diabetes mellitus, %	48	50	.42
Age, y	62 ± 7.5	62 ± 7.6	.75
Total cholesterol, mg/dL	153 ± 26	153 ± 27	.99
LDL cholesterol, mg/dL	77 ± 20	77 ± 21	.79
HDL cholesterol, mg/dL	46 ± 11	47 ± 12	.49
Triglycerides, mg/dL	151 ± 75	146 ± 78	.02
Apolipoprotein B, mg/dL	72 ± 15	71 ± 16	.06
Apolipoprotein A-I, mg/dL	123 ± 22	122 ± 22	.06
Glucose, mg/dL	116 ± 36	118 ± 41	.95
Insulin, pmol/L	118 ± 135	117 ± 109	.88
HOMA-IR	5.02 ± 8.09	5.04 ± 5.80	.78
Lipoprotein(a), mg/dL	30 ± 33	31 ± 33	.99
PCSK9, ng/mL	350 ± 120	340 ± 117	.11

HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL, low-density lipoprotein; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9.

Data are presented as percentage or mean ± standard deviation.

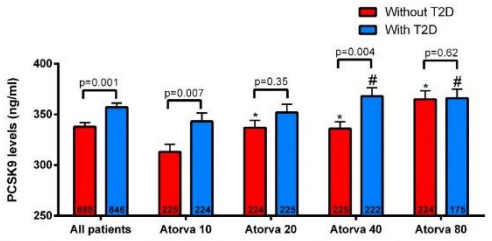


Figure 1 Plasma PCSK9 levels at baseline in patients with or without type II diabetes in the entire study sample and in patients separated on the basis of atorvastatin dose. *Significantly different from atorvastatin 10 mg group in patients without type II diabetes. #Significantly different from atorvastatin 10 mg group in patients with type II diabetes.

associated with LDL cholesterol, and to a much lower extent with total cholesterol, apoB, and HDL cholesterol. There was a weak but significant negative association between Lp(a) and triglycerides, fasting blood glucose, insulin, and HOMA-IR (Table 2). There was no significant correlation between PCSK9 and Lp(a) plasma levels.

We also measured PCSK9 and Lp(a) levels after 3 months of treatment either with placebo or with torcetrapib on top of atorvastatin doses established during the run-in period. Plasma PCSK9 levels significantly increased in patients treated with torcetrapib (+13.1 ± 125.3 ng/mL [ie, +3.7%], $P = .005$), but not in patients treated with placebo (+2.6 ± 127.9 ng/mL [ie, +0.7%], $P = .39$). Increases in PCSK9 levels with torcetrapib were statistically significant in patients with T2D only (Fig. 3). In contrast, plasma Lp(a) levels significantly decreased in patients treated with torcetrapib (−3.4 ± 10.7 mg/dL [−11.1%], $P < .0001$), but not in patients treated with placebo (+0.3 ± 9.4 mg/dL [+1%], $P = .92$). Decreases in Lp(a) were observed in patients with and without T2D (Fig. 4). Changes in PCSK9 were not associated with changes in Lp(a) levels in patients treated with torcetrapib (Spearman correlation coefficient $r = -0.03$, $P = .21$).

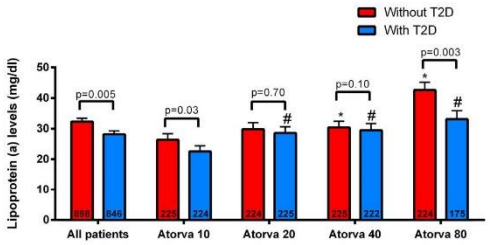


Figure 2 Plasma Lp(a) levels at baseline in patients with or without type II diabetes in the entire study sample and in patients separated on the basis of atorvastatin dose. *Significantly different from atorvastatin 10 mg group in patients without type II diabetes. #Significantly different from atorvastatin 10 mg group in patients with type II diabetes.

Table 2 Spearman correlation coefficients between PCSK9 and lipoprotein(a) levels and parameters of lipid metabolism or of glucose homeostasis

	PCSK9	Lipoprotein(a)
Total cholesterol	0.25 ($P < .0001$)	0.11 ($P < .0001$)
LDL cholesterol	0.15 ($P < .0001$)	0.21 ($P < .0001$)
HDL cholesterol	0.08 ($P = .0007$)	0.05 ($P = .03$)
Triglycerides	0.16 ($P < .0001$)	−0.11 ($P < .0001$)
Apolipoprotein B	0.22 ($P < .0001$)	0.06 ($P = .01$)
Apolipoprotein A-I	0.15 ($P < .0001$)	0.01 ($P = .63$)
Lipoprotein(a)	0.03 ($P = .38$)	–
PCSK9	–	0.03 ($P = .38$)
Glucose	0.14 ($P < .0001$)	−0.05 ($P = .04$)
Insulin	0.17 ($P < .0001$)	−0.05 ($P = .05$)
HOMA-IR	0.18 ($P < .0001$)	−0.06 ($P = .01$)

HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL, low-density lipoprotein; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9.

Discussion

In this sub-study of ILLUMINATE, a randomized clinical trial that documented the impact of CETP inhibition with torcetrapib on cardiovascular outcomes, we found that atorvastatin therapy was dose-dependently associated with higher PCSK9 and Lp(a) levels. The presence of T2D was also associated with higher PCSK9, but lower Lp(a) levels. We also showed that CETP inhibition with torcetrapib for 3 months slightly increased PCSK9 levels and decreased Lp(a) levels.

We found that atorvastatin therapy was dose-dependently associated with higher PCSK9 levels. It is well established that all statins significantly increase circulating PCSK9 levels compared either with placebo or pretreatment values in humans (as reviewed by Sahebkar

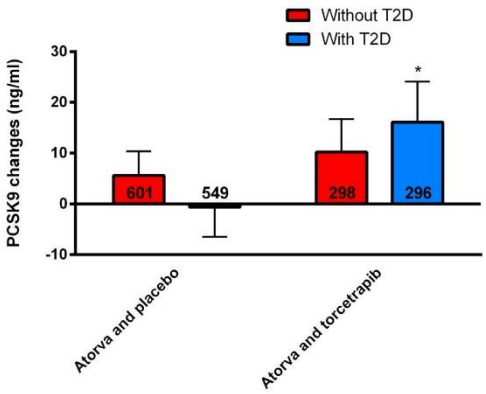


Figure 3 Changes in plasma PCSK9 levels after 3 months on placebo or torcetrapib in patients with and without type II diabetes. *Significantly different from baseline.

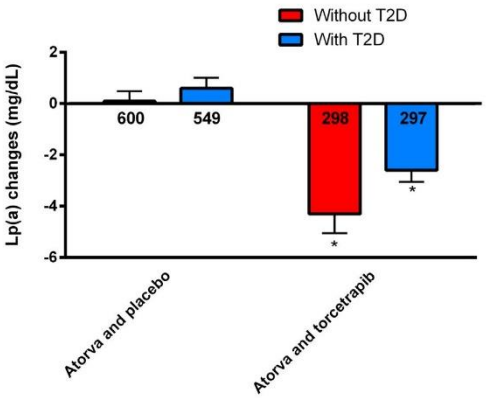


Figure 4 Changes in plasma Lp(a) levels after 3 months on placebo or torcetrapib in patients with and without type II diabetes. *Significantly different from baseline.

et al.[19]). Our study is the largest ever conducted on this topic and extends the results of a previous study on rosuvastatin[4] by comprehensively documenting for the first time a dose response association between statin and PCSK9 levels. Compared with patients on 10 mg atorvastatin, those on the maximal 80 mg atorvastatin treatment dose had 37 ng/mL higher plasma PCSK9 levels. This increase in PCSK9 levels is of the same magnitude to that reported in patients on 10 mg atorvastatin vs placebo or pretreatment values (ie, +40 ng/mL).[19] This observation underlines that the effects of atorvastatin on circulating PCSK9 levels are not linearly proportional to the treatment dose, similar to statin-mediated LDL cholesterol–lowering dose effects.[20]

We also observed in ILLUMINATE that higher atorvastatin doses were associated with elevated Lp(a) levels. The impact of statin therapy on Lp(a) levels is somewhat controversial. For instance, in the Aortic Stenosis Progression Observation: Measuring Effects of Rosuvastatin trial, 40 mg rosuvastatin promoted a 20% increase in circulating Lp(a) levels.[17] In the Treating to New Targets trial, we have shown that uptitration of atorvastatin doses from 10 to 80 mg/d was associated with a small but significant increase in Lp(a).[21] In the Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin trial however, 20 mg rosuvastatin did not significantly increase Lp(a) levels compared with pretreatment values.[22] In contrast, both atorvastatin and simvastatin reduced Lp(a) in a smaller cohort of heterozygous familial hypercholesterolemic patients.[23] We therefore cannot rule out that ILLUMINATE patients requiring higher doses of atorvastatin to achieve LDL cholesterol <100 mg/dL were those with higher untreated baseline Lp(a) levels because assays that measure LDL cholesterol also include the contribution of Lp(a) cholesterol.[24] In that respect, the single nucleotide polymorphism rs10455872, that is a strong predictor of plasma Lp(a) levels, is also the second most important genetic determinant of LDL cholesterol lowering with statins.[25]

Next, we showed that patients with T2D had higher PCSK9 levels than patients without T2D, as recently reported in a smaller cohort.[26] However, PCSK9 levels were not different between patients with vs without T2D in another smaller study.[27] Important questions still remain regarding the directionality and causality of this association. In that respect, insulin has been shown to enhance PCSK9 expression, which may argue in favor of T2D causing elevations in PCSK9 levels.[28,29] This observation is also supported by the recent publication of 2 large-scale genetic associations studies that have shown that loss-of-function variants at the PCSK9 loci associated with impaired PCSK9 function may be associated with an increased risk of T2D.[30,31]

In contrast, we found that Lp(a) levels were reduced in patients with T2D compared with patients without T2D. This result confirms previous studies showing lower Lp(a) levels in patients with T2D vs patients without T2D and extends the observations of 3 large prospective studies demonstrating a strong inverse association of Lp(a) levels with the risk of incident T2D (as reviewed by Tsimikas[8]). However, a genetic study challenged this association by showing that 4 single nucleotide polymorphism strongly correlated with the number of apo(a) kringle IV_2 repeats and Lp(a) levels did not predict T2D risk.[32] A potential explanation for reduced Lp(a) levels in patients with T2D is that insulin reduces apo(a) synthesis in primary hepatocytes.[33] More likely, because T2D is characterized by increased levels of triglyceride-rich apoB-containing lipoprotein, which is (unlike LDL) a poor acceptor for apo(a), there is probably a reverse causality between Lp(a) levels and T2D. In line with this hypothesis, Lp(a) was significantly and negatively correlated with plasma triglycerides in the present study.

We also found that torcetrapib reduced Lp(a) by 11%. Noteworthy, more potent CETP inhibitors such as anacetrapib, evacetrapib, and TA-8995 provide 25% to 40% reductions in Lp(a) levels.[34–36] Because CETP inhibition limits the net flux of triglycerides from triglyceride-rich lipoproteins to HDL and the net flux of cholesterol esters from HDL to triglyceride-rich lipoproteins particles, we speculate that fewer LDL-like particles might serve as substrate for Lp(a) assembly. In that respect, a recent genetic association study showed that genetic variants at the *LPA* locus linked with high Lp(a) levels were causally related with lower levels of circulating and triglyceride-rich lipoproteins particles. The directionality of this association clearly needs to be clarified.[37]

Finally, we found that CETP inhibition with torcetrapib provides a small but significant increase in PCSK9 levels, in patients with T2D, but not in patients without T2D. The fact that torcetrapib was found to have serious off-target effects[18] raises the possibility that the effects of torcetrapib observed in our study may have been unrelated to CETP inhibition. In contrast to our findings, other CETP inhibitors

were shown to reduce PCSK9 expression in vitro, in mice and monkeys.[38–41] Additional research will be needed to determine whether changes in PCSK9 levels result from a modulation of the canonical sterol regulatory element-binding protein 2 transcription factor pathway or from off-target effects of torcetrapib.

In humans, the impact of CETP inhibition on PCSK9 appears to rely on background lipid-lowering therapy.[42] In a study that included 39 mildly hypercholesterolemic patients, anacetrapib (100 mg/d) decreased PCSK9 levels by 18% in monotherapy but had no significant influence on PCSK9 levels (+3.4%) on top of atorvastatin 20 mg/d. Interestingly, plasma PCSK9 levels were weakly but positively associated with CETP activity in a cross-sectional study of 450 participants in a high-risk primary prevention setting.[43] Carriers of the PCSK9-R46L loss-of-function variant (linked with lower LDL cholesterol levels) also presented with lower CETP activity. This association has not been replicated in another study.[44] Thus, targeting CETP appears to influence PCSK9. Whether targeting PCSK9 also influences CETP activity will require confirmation.

We conclude that (1) both PCSK9 and Lp(a) levels are positively and dose-dependently increased by atorvastatin. The mechanisms by which statins increase PCSK9 levels are well known,[3,4] but those by which higher atorvastatin doses may increase Lp(a) levels remain elusive. (2) The presence of T2D is associated with higher PCSK9, but lower Lp(a) levels. Whereas impaired apoB-containing lipoprotein remodeling in T2D and on CETP inhibition appears to be a plausible causative mechanisms for reduced Lp(a) in those patients, it is not clear as to why patients with T2D have higher PCSK9 levels and why CETP inhibition with torcetrapib increased PCSK9 levels in these patients. The physiological link(s) between glycemic parameters, PCSK9, LDL receptor function, and Lp(a) metabolism clearly needs to be addressed in future studies.

Acknowledgments

Authors' contributions: B.J.A. co-designed the statistical analysis plan and wrote the article. F.P. and F.T. conducted experiments. W.B. performed statistical analyses. G.K.H., S.M.B., S.R.-M., O.M., and K.-A.R. reviewed the article. D.D., D.D.W., J.J.P.K., and P.B. participated to the study design and reviewed the article. G.L. participated in study design, co-designed the statistical analysis plan, conducted experiments, and reviewed the article. All authors have approved the final article.

Financial disclosure

This study was sponsored by Pfizer. B.J.A. holds a junior scholar award from the Fonds de recherche du Québec: Santé (FRQS), has received consulting fees from Pfizer and research support from Pfizer and Ionis Pharmaceuticals. F.P. is an Amgen employee. W.B. and D.D. are Pfizer employees. G.K.H. is holder of a Vidi grant (016.156.445) from the Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO), is supported by a grant from the CardioVascular Research Initiative (CVON2011-19; Genius) and the European Union (TransCard: FP7-603091-2). G.K.H. or his institution received honoraria for consultancy, advisory boards, and/or conduct of clinical trials from AMGEN, Aegerion, Pfizer, Astra Zeneca, Sanofi, Regeneron, KOWA, Ionis pharmaceuticals, and Cerenis. G.K.H. has received research support from Aegerion, AMGEN, Sanofi, Astra Zeneca, and Synageva. S.M.B. has received consulting fees from Pfizer. D.D.W. has received consulting fees and honoraria for lectures from Pfizer Inc and remuneration for serving on clinical trial committees from Sanofi Aventis, Regeneron, Resverlogix, and the Medicines Company. J.J.P.K. reports personal fees from Dezima, Cerenis, The Medicines Company, CSL, Behring, Amgen, Sanofi, Regeneron, Eli Lilly, Genzyme, Aegerion, Esperion, AstraZeneca, Omthera, Pronova, Vascular Biogenics, Boehringer Ingelheim, Catabasis, AtheroNova, UniQure, Novartis, Merck, Ionis Pharmaceuticals, and Kowa. P.B. is the chairman of the ILLUMINATE trial. He has received honoraria from Amgen, AstraZeneca, CSL-Behring, Lilly, Merck, Novartis, Pfizer, and Sanofi-Regerenon, has served on advisor boards for Amgen, AstraZeneca, CSL-Behring, Dezima, Lilly, Merck, Novartis, Pfizer, Sanofi-Regeneron, and has received research support from Merck and Pfizer. G.L. is the recipient of an Allocation de Recherche Chaire-Mixte (Inserm-Université de La Réunion) and a Programme de Recherche Hospitalière en Santé ANR-16-RHUS-0007. He has received research funding and honoraria from Affiris AG, Pfizer Inc, AMGEN, and Sanofi-Regeneron. F.T., S.R.-M., O.M., and K.-A.R. report no disclosure.

References

1. Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 2005;366:1267–1278.
2. Marais AD, Kim JB, Wasserman SM, Lambert G. PCSK9 inhibition in LDL cholesterol reduction: genetics and therapeutic implications of very low plasma lipoprotein levels. *Pharmacol Ther*. 2015;145:58–66.
3. 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;24:1454–1459.
4. Awan Z, Seidah NG, Macfadyen JG, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 concentrations, and LDL cholesterol response: the JUPITER trial. *Clin Chem*. 2012;58:183–189.
5. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, et al, ODYSSEY LONG TERM Investigators. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2015;372:1489–1499.
6. Sabatine MS, Giugliano RP, Wiviott SD, et al, Open-Label Study of Long-Term Evaluation against LDLCholesterol (OSLER) Investigators. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2015;372:1500–1509.

7. Desai NR, Kohli P, Giugliano RP, et al. AMG145, a monoclonal antibody against proprotein convertase subtilisin kexin type 9, significantly reduces lipoprotein(a) in hypercholesterolemic patients receiving statin therapy: an analysis from the LDL-C assessment with proprotein convertase subtilisin kexin type 9 monoclonal antibody inhibition combined with statin therapy (LAPLACE)-thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 57 trial. *Circulation*. 2013;128: 962–969.
8. Tsimikas S. Lipoprotein(a): novel target and emergence of novel therapies to lower cardiovascular disease risk. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2016;23:157–164.
9. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J*. 2010;31: 2844–2853.
10. Clarke R, Peden JF, Hopewell JC, et al. Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease. *N Engl J Med*. 2009;361:2518–2528.
11. Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, et al. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2013; 368:503–512.
12. Arsenault BJ, Boekholdt SM, Dube MP, et al. Lipoprotein(a) levels, genotype, and incident aortic valve stenosis: a prospective Mendelian randomization study and replication in a case-control cohort. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;7:304–310.
13. Kamstrup PR, Nordestgaard BG. Elevated lipoprotein(a) levels, LPA risk genotypes, and increased risk of heart failure in the general population. *JACC Heart Fail*. 2016;4:78–87.
14. Kronenberg F, Utermann G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *J Intern Med*. 2013;273:6–30.
15. van Capelleveen JC, van der Valk FM, Stroes ES. Current therapies for lowering lipoprotein(a). *J Lipid Res*. 2016;57:1612–1618.
16. Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, Lackner C, Chiesa G, Hobbs HH. Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein(a) concentrations. *J Clin Invest*. 1992;90:52–60.
17. Capoulade R, Chan KL, Yeang C, et al. Oxidized phospholipids, lipoprotein(a), and progression of calcific aortic valve stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66:1236–1246.
18. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 2007;357: 2109–2122.
19. Sahebkar A, Simental-Mendia LE, Guerrero-Romero F, Golledge J, Watts GF. Effect of statin therapy on plasma proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) concentrations: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Diabetes Obes Metab*. 2015;17: 1042–1055.
20. Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol*. 1998;81:582–587.
21. Arsenault BJ, Barter P, DeMicco DA, et al, Treating to New Targets (TNT) Investigators. Prediction of cardiovascular events in statin-treated stable coronary patients of the treating to new targets randomized controlled trial by lipid and non-lipid biomarkers. *PLoS One*. 2014;9:e114519.
22. Khera AV, Everett BM, Caulfield MP, et al. Lipoprotein(a) concentrations, rosuvastatin therapy, and residual vascular risk: an analysis from the JUPITER trial (Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin). *Circulation*. 2014;129: 635–642.
23. van Wissen S, Smilde TJ, Trip MD, de Boo T, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. Long term statin treatment reduces lipoprotein(a) concentrations in heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Heart*. 2003;89:893–896.
24. Yeang C, Witztum JL, Tsimikas S. 'LDL-C' = LDL-C + Lp(a)-C: implications of achieved ultra-low LDL-C levels in the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 era of potent LDL-C lowering. *Curr Opin Lipidol*. 2015;26:169–178.
25. Postmus I, Trompet S, Deshmukh HA, et al. Pharmacogenetic meta-analysis of genome-wide association studies of LDL cholesterol response to statins. *Nat Commun*. 2014;5:5068.
26. Ibarretxe D, Girona J, Plana N, et al. Circulating PCSK9 in patients with type 2 diabetes and related metabolic disorders. *Clin Investig Arterioscler*. 2016;28:71–78.
27. Brouwers MC, Troutt JS, van Greevenbroek MM, et al. Plasma proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is not altered in subjects with impaired glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus, but its relationship with non-HDL cholesterol and apolipoprotein B may be modified by type 2 diabetes mellitus: the CODAM study. *Atherosclerosis*. 2011;217:263–267.
28. 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;281:6211–6218.
29. Miao J, Manthena PV, Haas ME, et al. Role of insulin in the regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:1589–1596.
30. Ference BA, Robinson JG, Brook RD, et al. Variation in PCSK9 and HMGCR and risk of cardiovascular disease and diabetes. *N Engl J Med*. 2016;375:2144–2153.
31. Schmidt AF, Swerdlow DI, Holmes MV, et al. PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a Mendelian randomisation study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5:97–105.
32. Emdin CA, Khera AV, Natarajan P, et al. Phenotypic characterization of genetically lowered human lipoprotein(a) levels. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68:2761–2772.
33. Neele DM, de Wit EC, Princen HM. Insulin suppresses apolipoprotein(a) synthesis by primary cultures of cynomolgus monkey hepatocytes. *Diabetologia*. 1999;42:41–44.
34. Cannon CP, Shah S, Dansky HM, et al. Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2010;363:2406–2415.
35. Nicholls SJ, Ruotolo G, Brewer HB, et al. Evacetrapib alone or in combination with statins lowers lipoprotein(a) and total and small LDL particle concentrations in mildly hypercholesterolemic patients. *J Clin Lipidol*. 2016;10:519–527.e4.
36. Hovingh GK, Kastelein JJ, van Deventer SJ, et al. Cholesterol ester transfer protein inhibition by TA-8995 in patients with mild dyslipidaemia (TULIP): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet*. 2015;386:452–460.
37. Kettunen J, Demirkan A, Wurtz P, et al. Genome-wide study for circulating metabolites identifies 62 loci and reveals novel systemic effects of LPA. *Nat Commun*. 2016;7:11122.
38. Dong B, Singh AB, Fung C, Kan K, Liu J. CETP inhibitors downregulate hepatic LDL receptor and PCSK9 expression in vitro and in vivo through a SREBP2 dependent mechanism. *Atherosclerosis*. 2014;235:449–462.
39. Miyosawa K, Watanabe Y, Murakami K, et al. New CETP inhibitor K-312 reduces PCSK9 expression: a potential effect on LDL cholesterol metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015;309:E177–E190.
40. van der Tuin SJ, Kuhnast S, Berbee JF, et al. Anacetrapib reduces (V) LDL cholesterol by inhibition of CETP activity and reduction of plasma PCSK9. *J Lipid Res*. 2015;56:2085–2093.
41. Roddy TP, McLaren DG, Chen Y, et al. Effects of anacetrapib on plasma lipids, apolipoproteins and PCSK9 in healthy, lean rhesus macaques. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:410–416.
42. Millar JS, Reyes-Soffer G, Jumes P, et al. Anacetrapib lowers LDL by increasing ApoB clearance in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest*. 2015;125:2510–2522.
43. Girona J, Ibarretxe D, Plana N, et al. Circulating PCSK9 levels and CETP plasma activity are independently associated in patients with metabolic diseases. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:107.
44. Verbeek R, Boyer M, Boekholdt SM, et al. Carriers of the PCSK9 R46L variant are characterized by an antiatherogenic lipoprotein profile assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy—Brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:43–48.

Discussion et perspectives

Notre étude a permis de mettre en évidence pour la première fois au sein de la même cohorte (Illuminate) que les concentrations plasmatiques de PCSK9 sont plus élevées chez les patients diabétiques de type 2 comparés aux normoglycémiques (375±123ng/ml vs. 338±115ng/ml, p=0,0012). Le traitement avec des doses croissantes d'atorvastatine a induit une augmentation des concentrations de PCSK9 similaire chez les diabétiques et non diabétiques.

PCSK9 a été dosé au niveau plasmatique dans de nombreuses études incluant des normoglycémiques et des diabétiques (Lagace et al., 2006; Alborn et al., 2007; Mayne et al., 2007; Lambert et al., 2008). Néanmoins, ces tests ELISA ont été réalisés avec des tests différents sur des populations différentes, à des temps différents et par des expérimentateurs différents. Ainsi, la variation entre les concentrations de PCSK9 est très étendue (de 11ng/ml à 13 390ng/ml), rendant difficile les comparaisons. Nous avons réalisé ces dosages partir du plasma des patients au moment de l'inclusion en utilisant le même test ELISA commercial qui faisait consensus (Cyclex) et avec le même expérimentateur ce qui a diminué grandement l'étendue de la variation des concentrations de PCSK9. La stratification des patients en fonction des doses d'atorvastatine a révélé que les concentrations de PCSK9 augmentent suite à un traitement avec une statine, confirmant les données de la littérature (Sahebkar et al., 2015). Néanmoins, comme pour la diminution des taux de LDL-C, l'effet des statines sur l'augmentation de PCSK9 n'est pas linéaire (Jones et al., 1998).

Comparée aux études antérieures, notre étude comporte un plus grand nombre de patients. En effet, nous avons dosé PCSK9 dans le plasma de 1 745 patients comparé à 106 patients en moyenne dans les autres études. Notre étude était aussi, de loin, la plus complète en terme de mesure de paramètres cliniques et biologiques. Il a donc été possible d'établir des corrélations entre les concentrations plasmatiques en PCSK9 et plusieurs paramètres autres que lipidiques comme la glycémie ou l'HOMA-IR. Néanmoins, notre étude comporte certaines limites et

notamment l'absence de groupe de patients ou d'individus sans traitement à l'atorvastatine. De plus, il s'agit d'un essai clinique randomisé avec des critères d'inclusion stricts. Par exemple, l'ensemble des individus inclus devait avoir un LDL-C inférieur ou égal à 100mg/dl après traitement à l'atorvastatine ce qui limite un peu la généralisation des conclusions de cette étude.

Les dosages de PCSK9 réalisés dans cette étude nous ont permis d'établir des corrélations entre PCSK9 et différents paramètres dont la glycémie, l'insulinémie et l'indice d'insulinorésistance HOMA-IR. Il est ressorti de notre étude que le taux de PCSK9 plasmatique est corrélé de façon positive à ces 3 paramètres. La causalité de cette association reste à déterminer. Autrement dit, est-ce qu'une augmentation de PCSK9 dans la circulation induirait une augmentation de la glycémie, de l'insulinémie et de la résistance à l'insuline ou en est-ce la conséquence ? En effet, il a été montré, d'une part, que l'insuline augmente l'expression de PCSK9 (Costet et al., 2006; Miao et al., 2015) et d'autre part, dans 2 larges études Mendéliennes randomisées que les formes LOF de PCSK9 sont associées à une augmentation du risque de développer un DT2 (Ference et al., 2016; Schmidt et al., 2017).

En conclusion, nous avons montré dans cette étude que les concentrations plasmatiques de PCSK9 sont plus élevées chez les patients diabétiques de types 2 et confirmé dans la plus grande cohorte testée à ce jour que les statines induisent une augmentation du niveau de PCSK9. Néanmoins, cet effet n'est pas linéaire en fonction de la dose de statine. Nous avons également montré que le taux circulant en PCSK9 est corrélé de façon positive à la glycémie, l'insulinémie et l'indice HOMA-IR. Ces résultats suggèrent que PCSK9 pourrait être prédictif de la survenue du DT2.

3. Deuxième article

Les niveaux plasmatiques de PCSK9 ne sont pas associés à une conversion au diabète de type 2

Stéphane Ramin-Mangata, Matthieu Wargny, Matthieu Pichelin, Cédric Le May, Aurélie Thédrez, Valentin Blanchard, Brice Nativel, Raul D. Santos, Isabela M. Benseñor, Paulo A. Lotufo, Gilles Lambert*, Bertrand Cariou*

* contribution égale

Publié dans Atherosclerosis (2020) 293, 49-56

Dans l'étude JUPITER, une association a été établie entre l'utilisation de statine à forte dose et l'apparition de diabète de type 2 chez les individus prédisposés (Ridker et al., 2012). De plus, des études Mendéliennes randomisées ont mis en évidence une corrélation positive entre les variants génétiques de *PCSK9*, de *l'HMGCR*, du *LDLR* favorisant une diminution du LDL-C et le risque de DT2 (Ference et al., 2016; Lotta et al., 2016; Schmidt et al., 2017). Ces études suggèrent que la sur-activation du LDLR favoriserait l'apparition du DT2. PCSK9 est un inhibiteur du LDLR. Ainsi, il semblerait qu'inhiber PCSK9 pourrait être délétère et favoriser d'autant plus le risque de développer un DT2. En 2015, des anticorps dirigés contre PCSK9 ont été mis sur le marché. Les premières études après un traitement avec un inhibiteur de PCSK9 ne montrent pas d'augmentation de la survenue du DT2 (Colhoun et al., 2016; Sabatine et al., 2017c; Sattar et al., 2017; Ray et al., 2019b). Néanmoins, le temps de suivi des patients et leur nombre est insuffisant pour statuer sur le risque de développer un DT2. Dans la première étude, nous avons reporté pour la première fois que les niveaux plasmatiques de PCSK9 sont plus élevés chez les patients diabétiques de type 2 comparés à des non-diabétiques. Ainsi, le dosage de PCSK9 pourrait être un marqueur prédictif de la bascule vers le DT2 chez les individus prédiabétiques. Dans cette deuxième étude, j'ai déterminé les niveaux de PCSK9 dans le plasma

d'individus de deux cohortes au moment de leur inclusion : les cohortes ELSA-Brasil (Etude longitudinale de la santé des adultes) et IT-DIAB (Innovation thérapeutique diabète).

La cohorte en population générale ELSA-Brasil est une cohorte brésilienne composée de plus de 15 000 individus en bonne santé. Le plasma, le profil lipidique et d'autres paramètres biologiques de ces individus à l'inclusion sont disponibles. Au travers d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Lotufo, nous avons eu accès au plasma de 2 100 individus de la région de Sao Paulo collecté au moment de leur inclusion entre 2008 et 2010. Ces individus étaient non diabétiques au moment de l'inclusion et n'avaient ni évènement cardiovasculaire ni problème rénal ou hépatique documentés. Ces individus ont été suivis pendant 4 ans. La variation de leur état glycémique a été évaluée à l'inclusion et à la fin du suivi. La cohorte IT-DIAB est une cohorte française composée de plus de 303 individus prédiabétiques inclus entre 2010 et 2013. L'état glycémique de ces individus a été suivi pendant 5 ans. En collaboration avec l'équipe du Pr. Cariou, nous avons eu accès au plasma de ces individus. Pour l'ensemble des individus des 2 cohortes la conversion d'un état non-diabétique vers un prédiabète ou la survenue d'un diabète de type 2 a été documentée.

Mon second objectif de thèse était de déterminer si le taux de PCSK9 circulant est un marqueur prédictif ou non de la survenue du DT2. Nous avons analysé les liens entre les concentrations plasmatiques de PCSK9 et la variation de la glycémie et la survenue du diabète de type 2. Par le biais de cette étude nous avons pu estimer si l'inhibition de PCSK9 représente ou non un risque de développer un diabète de type 2.

Atherosclerosis 293 (2020) 49–56

Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

Circulating PCSK9 levels are not associated with the conversion to type 2 diabetes

Stéphane Ramin-Mangata[a,1], Matthieu Wargny[b,c,d,1], Matthieu Pichelin[b,c], Cédric Le May[b], Aurélie Thédrez[b], Valentin Blanchard[a], Brice Nativel[a], Raul D. Santos[e,f,g], Isabela M. Benseñor[g], Paulo A. Lotufo[g], Gilles Lambert[a,*,2], Bertrand Cariou[b,c,**,2]

[a] Université La Réunion, Inserm UMR 1188 DéTROI, Sainte Clotilde, France
[b] L'institut Du Thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France
[c] L'institut Du Thorax, Department of Endocrinology, CIC 1413 INSERM, CHU Nantes, Nantes, France
[d] CHU de Nantes, INSERM, CIC 1413, Pôle Hospitalo-Universitaire 11: Santé Publique, Clinique des Données, Nantes, F-44093, France
[e] Lipid Clinic Heart Institute (InCor), University of Sao Paulo Medical School Hospital, São Paulo, Brazil
[f] Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil
[g] Center of Clinical and Epidemiologic Research, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

HIGHLIGHTS

- Like statins, PCSK9 inhibitors have been proposed to increase the risk of new onset diabetes (NOD).
- We show that PCSK9 levels do not predict the transition from prediabetes to NOD.
- Inhibiting circulating PCSK9 should be safe for glucose homeostasis.

ARTICLE INFO

Keywords:
PCSK9
PCSK9 inhibition
New onset diabetes
Type 2 diabetes

ABSTRACT

Background and aims: PCSK9 is an endogenous inhibitor of the LDL receptor pathway. Recently, Mendelian randomization studies have raised a doubt about the diabetogenic risk of PCSK9 inhibitors. Here, we assessed the relationship between plasma PCSK9 levels and the risk of new onset diabetes (NOD).
Methods: Fasting plasma PCSK9 levels were measured at baseline by ELISA in subjects without lipid lowering treatment in IT-DIAB (n = 233 patients with prediabetes, follow-up 5 years) and ELSA-Brasil (n = 1751; 27.5% with prediabetes, follow-up 4 years) prospective cohorts. The primary outcome in both studies was the incidence of NOD. The association of NOD with plasma PCSK9 levels was studied using multivariable Cox models.
Results: Plasma PCSK9 levels were not significantly associated with NOD in IT-DIAB (HR (+1SD) 0.96, $CI_{95\%}$ [0.76; 1.21]) and ELSA-Brasil (OR (+1SD) 1.13 [0.89; 1.42]). In ELSA-Brasil, a significant positive association between PCSK9 and worsening of glucose homeostasis, including the progression from normoglycemia to prediabetes, was found (OR (+1SD) 1.17 [1.04; 1.30], $p = 0.0074$). Plasma PCSK9 concentration was also positively associated with the change in fasting plasma glucose between the first and second visit in ELSA-Brasil ($\beta = 0.053$, $CI_{95\%}$ [0.006; 0.10], $p = 0.026$). Plasma PCSK9 levels positively correlated with total cholesterol in IT-DIAB and ELSA-Brasil, but not with glucose homeostasis parameters, except for a positive correlation with HOMA-IR in ELSA-Brasil.
Conclusions: Plasma PCSK9 levels were not significantly associated with NOD risk in longitudinal analyses. These data suggest that inhibition of the PCSK9 extra-cellular pathway should not be deleterious for glucose homeostasis.

* Corresponding author. Inserm UMR 1188 DéTROI, Plateforme CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, 97490 Sainte Clotilde, France.
** Corresponding author. Clinique d'Endocrinologie, Hôpital Guillaume & René Laennec, Boulevard Jacques Monod, Saint-Herblain, 44093, Nantes Cedex 1, France.
E-mail addresses: gilles.lambert@univ-reunion.fr (G. Lambert), bertrand.cariou@univ-nantes.fr (B. Cariou).
[1] These authors contributed equally as co-first authors.
[2] These authors contributed equally as co-last authors.

https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.027
Received 24 September 2019; Received in revised form 7 November 2019; Accepted 27 November 2019
Available online 28 November 2019
0021-9150/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Recent studies have shown an inverse relationship between low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) homeostasis and risk of type 2 diabetes. The first signal came from the JUPITER trial with rosuvastatin and was further confirmed by several meta-analyses of randomized controlled trials with statins [1]. Despite their undisputable beneficial effects in lowering LDL-C and cardiovascular diseases, statins have shown to slightly, but significantly, increase the risk of NOD [2–6]. Next, Mendelian randomization studies indicated that loss-of-function (LOF) variants in the 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase (*HMGCR*) gene, the molecular target of statins, are associated with an increased risk of NOD. This suggests that the diabetogenic effect of statins is a true on-target effect operating via an up-regulation of the LDLR pathway [7]. Conversely, diabetes prevalence is twice lower in patients with familial hypercholesterolemia, compared with their non-affected relatives, with diabetes risk being maximally reduced in carriers of the most severe mutations in LDLR [8].

Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9 (PCSK9) is an endogenous inhibitor of the LDLR pathway that acts by directing LDLR towards lysosomal degradation. Commercially available PCSK9 inhibitors (alirocumab and evolocumab) are fully human monoclonal antibodies (mAb) that bind circulating PCSK9 and prevent its interaction with LDLR at the cell surface, precluding LDLR intracellular degradation [9]. Since statins and PCSK9 inhibitors reduce LDL-C by increasing the abundance of LDLR at the surface of many cell types, in particular hepatocytes [10,11], a relevant question is to determine whether PCSK9 inhibitors might also increase the risk of diabetes in humans.

This hypothesis is underpinned by the observation that some PCSK9 knockout mouse models [12,13], but not all [14], display hyperglycemia, impaired glucose tolerance, and reduced insulin secretion. This deleterious effect of PCSK9-deficiency on glucose homeostasis is apparently mediated by LDLR [13]. More importantly, Mendelian randomization studies showed that *PCSK9* LOF variants associate with higher fasting plasma glucose (FPG) and a higher risk of diabetes [15–17]. The odds ratio for diabetes associated with *HMGCR* and *PCSK9* LOF variants appears to be proportional to the extent of LDL-C lowering induced by those variants [17].

To gain further insights into the possibility that inhibiting PCSK9 in the plasma with PCSK9 mAb may be diabetogenic, we assessed the relationship between circulating PCSK9 levels and the risk of NOD in two longitudinal cohorts.

2. Materials and methods

2.1. Study population

The study populations belong to the IT-DIAB study (Innovation Thérapeutique-Diabète NCT01218061 & NCT01432509) and ELSA-Brasil (Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto, NCT02320461).

IT-DIAB - Briefly, the IT-DIAB study is a 5-year prospective, observational study designed to identify new biomarkers of type 2 diabetes risk in a population with prediabetes. The population was recruited in the occupational centers of three French cities: Nantes, Saint-Nazaire and Lille. The institutional ethics committee approved the protocol, and all the reported investigations have been carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki as revised in 2008. All patients underwent baseline visit between June 2010 and February 2013, including a medical interview, signing of the informed consent, self-administered questionnaire of diabetes risk score, physical examination (including body weight, height, waist and hip circumference measurements) and blood sampling. Patients without history of diabetes and with impaired fasting glucose (IFG; WHO criteria) were eligible for the IT-DIAB study. The main exclusion criteria were a history of treatment with oral anti-diabetic agents or insulin (with the exception of gestational diabetes), severe coagulation disorder or thrombocytopenia (platelets levels $< 100{,}000/mm^3$), severe renal insufficiency (defined using MDRD equation as eGFR $< 30mL/min.1.73\ m^2$), severe liver impairment (prothrombin ratio $< 50\%$), severe psychiatric disorders, alcohol abuse (estimated > 30 g/day), patient's opposition or inability to participate at least 5 years in the study. For the present analysis, we also secondarily excluded the population with concomitant statin therapy. Ultimately, 233 patients with at least one follow-up visit were considered for the present analysis (see flowchart in Supplemental Fig. 1 and Supplemental Table 2).

ELSA-Brasil - The ELSA-Brasil study design and cohort profile have been published elsewhere [18,19]. Briefly, it is a cohort of 15,105 men and women apparently healthy active and retired civil servants living in six Brazilian cities (Belo Horizonte, Porto Alegre, Rio de Janeiro, Salvador, Sao Paulo, and Vitoria), aged between 35 and 74 years at baseline. Information on sociodemographic, clinical history, family history of diseases, lifestyle factors, mental health, cognitive status, and occupational exposure was assessed from August 2008 to December 2010. Anthropometric measurements and laboratory and imaging tests were also obtained. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the local institutional review boards. All participants signed the informed consent before enrollment. Participants enrolled in the Sao Paulo site (5060 persons in total) without diabetes (non-inclusion criteria: FPG $\geq$ 126 mg/dL and/or 2-h post-load glucose $\geq$ 200 mg/dL and/or history of treatment with oral anti-diabetic agents or insulin), without cardiovascular, renal or hepatic diseases (exclusion criteria: self-reported history of medical diagnosis of these pathologies), and who did not report prescription of lipid-lowering agents, were eligible for this ancillary and exploratory study. We randomly selected 1751 eligible participants fulfilling the inclusion criteria for subsequent PCSK9 plasma concentrations measurements, corresponding to a third of participants enrolled in the Sao Paulo site (Supplemental Table 2).

2.2. Biochemical analyses

IT-DIAB - During the baseline visit, peripheral venous blood samples were obtained in the morning after an overnight fast for biological analysis and the constitution of a biocollection. Standard biological analyses included FPG, A1C, and lipid profile (direct measurements of total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and triglycerides (TG); LDL-C was calculated using the Friedewald equation and non-HDL-C was calculated as TC minus HDL-C). Frozen heparinized plasma was used for insulin measurement by electrochemiluminescent enzyme immunoassay (ECLIA) using the Cobas e-automated clinical analyzer system (Roche Diagnostics, Meylan, France). Plasma high molecular weight (HMW) adiponectin levels were measured by ECLIA on an automated clinical analyzer system Lumipulse G600 (Fujirebio, Les Ulis, France). A standardized 75 g oral glucose tolerance test (OGTT) was performed in all participants utilizing an anhydrous glucose solution. Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was defined according to the equation proposed by Matthews et al. [20].

ELSA-Brasil - A 12-h fasting blood sample was drawn in the morning soon after arrival at the research clinic, following standardized procedures for samples collection and processing. A standardized 75 g oral glucose tolerance test (OGTT) was performed in all participants without known diabetes utilizing an anhydrous glucose solution. For measurement of fasting and post-load glucose we used the hexokinase method (ADVIA 1200, Siemens); for fasting and post-load insulin, an immunoenzymatic assay; for A1C, high-pressure liquid chromatography. TC, HDL-C and TG were measured with enzymatic colorimetric assays (ADVIA Chemistry). LDL-C was calculated using the Friedewald equation. When TG were $\geq$400 mg/dL, LDL-C was measured directly with an enzymatic colorimetric assay (ADVIA Chemistry).

PCSK9 assays - Total PCSK9 plasma concentrations were determined

Table 1
Baseline characteristics of the statin-free populations of the IT-DIAB and ELSA-Brasil cohorts, and correlation with PCSK9.

	IT-DIAB (n = 233)		ELSA-Brasil (n = 1751)	
	Description	Correlation with PCSK9 (*p* -value)[b]	Description	Correlation with PCSK9 (*p*-value)[b]
Clinical characteristics				
Age (years)	**56.3 ± 9.8**	**−0.18 (0.0048)****	50.4 ± 8.4	0.04 (0.084)
Women	**76 (32.6%)**	–	888 (50.7%)	–
BMI (kg/m^2)	29.7 ± 6.3	−0.06 (0.34)	26.9 ± 4.6	0.03 (0.28)
Waist circumference (cm)	98.0 ± 14.3	−0.12 (0.065)	89.3 ± 11.7	0.03 (0.23)
Postmenopausal women	NA	–	384 (43.2%)	–
Lipid profile				
Total cholesterol (mg/dL)	**223.1 ± 38.8**	**0.17 (0.0089)****	**215.8 ± 38.5**	**0.09 (0.00033)*****
Triglycerides (mg/dL)	133.0 ± 79.0	0.03 (0.62)	**133.1 ± 84.0**	**0.08 (0.0015)****
LDL-C (mg/dL)	143.2 ± 34.9	0.12 (0.083)	**134.1 ± 33.0**	**0.08 (0.0011)****
HDL-C (mg/dL)	53.1 ± 15.3	0.04 (0.50)	55.6 ± 13.9	0 (0.99)
Non-HDL-C (mg/dL)	169.7 ± 40.3	0.12 (0.074)	**160.2 ± 37.1**	**0.10 (< 0.0001)*****
ApoA1 (mg/dL)	NA	–	156.6 ± 22.2	0.01 (0.66)
ApoB (mg/dL)	NA	–	**107.2 ± 23.1**	**0.08 (0.00082)*****
PCSK9 (ng/mL)	260.3 ± 95.0	–	318.7 ± 82.6	–
Glucose homeostasis				
Fasting PG (mg/dL)	115.7 ± 4.4	−0.02 (0.74)	101.0 ± 6.1	0.04 (0.13)
PG 2 h after OGTT (mg/dL)	NA	–	122.6 ± 25.0	−0.01 (0.59)
HbA_{1c} (%)	5.8 ± 0.4	0.01 (0.89)	5.3 ± 0.5	0.03 (0.17)
HbA_{1c} (mmol/mol)	40.3 ± 4.9	0.01 (0.89)	34.1 ± 5.9	0.03 (0.17)
Fasting insulin (mUI/L)	13.7 ± 9.3	0.05 (0.48)	**12.0 ± 7.9**	**0.06 (0.015)**[a]
Insulin after OGTT (mUI/L)	NA	–	83.2 ± 69.1	0.04 (0.14)
HOMA-β	75.8 (53.6–117.4)	0.03 (0.69)	**114.8 ± 75.9**	**0.05 (0.028)**[a]
HOMA-IR	3.9 ± 2.7	0.05 (0.49)	**2.6 (1.8–3.7)**	**0.06 (0.01)**[a]
Adiponectine (μg/mL)	3.4 (2.3–4.8)	0.03 (0.71)	NA	–

Data are presented using size (%), mean ± standard deviation or median (25th-75th percentiles). ApoA1: apolipoprotein A1; ApoB: apolipoprotein B; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance; NA: data not available; OGTT: oral-glucose tolerance test; PG: plasma glucose.
[a] *p*-value 0.01–0.05; ** *p*-value 0.001–0.01; *** *p*-value < 0.001.
[b] Correlation with PCSK9: Spearman's correlation coefficient.

using the Quantikine SPC900 ELISA kit (R&D Systems, Lille, France) [21]. Briefly, plasma samples were diluted 1:20 in the *calibrator diluent* onto ELISA plates and incubated for 2hrs on a plate shaker at 450 rpm. Wells were rinsed with *wash buffer* using an automated Hydroflex TECAN microplate washer. The detection HRP-conjugated antibody was added to each well and plates were incubated for 2 h at 450 rpm. Wells were rinsed. The TMB substrate solution was added to each well and plates were further incubated in the dark for 30 min at 450 rpm. Reactions were stopped by the addition of 0.2 N acid sulphuric solution. Absorbance was read at 450 nm with reference at 540 nm on an Infinite 200 pro TECAN plate-reader. These measurements were performed by the same experimentator (SR-M), on the same site and using the same materials for both cohorts.

2.3. Follow-up and conversion to new onset diabetes

IT-DIAB - The end of the follow-up occurred at the fifth yearly visit, or prematurely if the patient met one of the following criteria: patient's withdrawal or loss to follow-up, inappropriate prescription of anti-diabetic agent, bariatric surgery or death. NOD was defined by a FPG value ≥ 126 mg/dL and/or a plasma glucose ≥200 mg/dL after 2-h OGTT.

ELSA-Brasil - In ELSA-Brasil, 2-h OGTT was performed for all patients both at baseline and at 4-year visit. Diabetes status was classified as diabetes, prediabetes or normal glucose levels. NOD was defined as a FPG value ≥ 126 mg/dL or a plasma glucose ≥200 mg/dL after 2-h OGTT. Prediabetes was defined as no NOD and either FPG value between 110 and 125 mg/dL or a plasma glucose between 140 and 199 mg/dL after 2-h OGTT. Normal glucose level was defined as neither NOD nor prediabetes. Finally, the worsening of glucose homeostasis was defined as a shift between baseline and 4-year visit, either from normal glucose level to prediabetes or NOD, or from prediabetes to NOD.

2.4. Statistical analyses

Baseline categorical parameters are presented using frequencies (percentages), continuous parameters are presented using mean ± SD or median (25th – 75th percentiles) in case of a skewed distribution. The correlation between plasma PCSK9 levels and the other parameters is expressed by the corresponding Spearman's rank coefficients. We analysed follow-up data through two outcomes: the incidence of NOD and the change in FPG. In IT-DIAB, the incidence of NOD was examined by drawing the Kaplan-Meier curves according to quartiles of plasma PCSK9 level. A Cox model was used to determine the association between plasma PCSK9 levels (as a continuous parameter) and the incidence of NOD, before and after adjustment for classical risk factors retained after stepwise selection, such as age at baseline, sex, waist circumference, FPG, TG, LDL-C, HDL-C and adiponectin. For ELSA-Brasil, a logistic regression model was used to assess the relationship between baseline PCSK9 and the incidence of NOD during the four-year visit, adjusted for the same parameter as the above Cox model, except for adiponectin that was not measured in this population.

In both cohorts, FPG change was defined as the difference between baseline and last FPG, measured at the end of follow-up in IT-DIAB and at the 4-year visit in ELSA-Brasil. We used univariable and multivariable linear regression to assess the association between PCSK9 and FPG change. The parameters considered as potential confounders before stepwise selection were the same as in the Cox model above. We also used fractional polynomial transformation to capture a possible non-linear effect of the exposure, with a model selection threshold fixed at 0.20, but only linear models were withheld by this approach [22].

Sensitivity analyses were performed in a subset of the ELSA-Brasil cohort with prediabetes at baseline. In particular, correlations between baseline PCSK9 and changes in FPG between baseline and 4-year visit were determined.

A *p*-value < 0.05 was deemed statistically significant. All statistical

analyses were performed using R software version 3.5.1 with Rstudio interface (The R Foundation for Statistical Computing, R Core Team 2018, Vienna, Austria).

3. Results

3.1. Baseline characteristics of study participants

Study population characteristics at baseline in ELSA-Brasil and IT-DIAB cohorts are reported in Table 1. The analytical study population was on average middle aged (mean ± SD: 56.3 ± 9.8 and 50.4 ± 8.4 years in IT-DIAB and ELSA-Brasil, respectively) and overweight (mean BMI ± SD: 29.7 ± 6.3 and 26.9 ± 4.6 kg/m^2 in IT-DIAB and ELSA-Brasil, respectively). In IT-DIAB, all participants had prediabetes at baseline with IFG (mean FPG ± SD: 115.7 ± 4.4 mg/dL); compared to only 27.5% (482/1751) in ELSA-Brasil (mean FPG ± SD: 101.0 ± 6.1 mg/dL). The selected participants of both cohorts were not under statin therapy. Plasma lipid parameters were in the normal range with mean (± SD) LDL-C concentrations of 143 ± 35 and 134 ± 33 mg/dL in IT-DIAB and ELSA-Brasil, respectively. Baseline characteristics of the two populations according to diabetes status (NOD *vs* no NOD) at the final visit are shown in Supplementary Table 1. Baseline plasma PCSK9 levels were lower in IT-DIAB (260 ± 95 ng/mL) than in ELSA-Brasil (319 ± 83 ng/mL) (Table 1). The histograms of baseline fasting plasma PCSK9 level distribution according to diabetes status at the end of follow-up in both cohorts did not highlight obvious differences between groups (Supplementary Fig. 2).

3.2. Plasma PCSK9 levels and risk of NOD during follow-up

After a 5-year follow-up in IT-DIAB, 36.9% of participants (86/233) converted to NOD. The Kaplan-Meier survival curves showed that plasma PCSK9 levels (classified as quartiles) were not associated with the risk of conversion to NOD (p = 0.87, log-rank test) (Fig. 1). Similar results were obtained when using tertiles of plasma PCSK9 levels (p = 0.93, log-rank test; data not shown). In Cox models using a continuous approach, baseline plasma PCSK9 levels were not associated with NOD during follow-up, both before and after adjustment (HR [+1 SD] = 0.93, $CI_{95\%}$ [0.74; 1.15] and 0.96 [0.76; 1.21], respectively) (Table 2). After stepwise selection, factors associated with the risk of conversion to NOD were waist circumference, FPG and fasting TG. In ELSA-Brasil, 3.9% (69/1751) of participants developed NOD at the second visit at 4 years. As in IT-DIAB, plasma PCSK9 levels were not associated with the risk of NOD neither in univariable nor in multivariable logistic regression: OR (+1 SD) = 1.17 [0.93; 1.47] (p = 0.18) and 1.13 [0.89; 1.41] (p = 0.31), respectively. A multivariable approach adjusted on the same parameters as IT-DIAB Cox model demonstrated that waist circumference (OR (+1 SD) = 1.33 [1.04; 1.70], p = 0.024) and FPG (OR (+1 SD) = 1.79 [1.41; 2.28], $p <$ 0.0001) were associated with the risk of NOD, while TG did not reach statistical significance (OR (+1 SD) = 1.17 [0.97; 1.37], p = 0.064). Furthermore, when considering the combined event of worsening of glucose homeostasis (*i.e.* progression from normoglycemia to prediabetes or NOD and progression from prediabetes to NOD), we found a significant positive association with PCSK9 in both univariable and multivariable approaches: OR (+1 SD) = 1.18 [1.06; 1.32] (p = 0.0031) and 1.17 [1.04; 1.30] (p = 0.0074), respectively.

3.3. Cross-sectional associations between plasma PCSK9 levels and metabolic parameters

Spearman's rank correlations were assessed between plasma PCSK9 and metabolic parameters at baseline (Table 1). Plasma PCSK9 levels were positively associated with total cholesterol in both IT-DIAB (r = 0.17; p = 0.009) and ELSA-Brasil (r = 0.09; p = 0.0003). Significant positive associations were also found between PCSK9 and LDL-C (r = 0.08; p = 0.001), TG (r = 0.08; p = 0.002) and ApoB (r = 0.08; p = 0.0008) in ELSA-Brasil. Regarding glucose homeostasis parameters, plasma PCSK9 was not associated with either FPG or A1C. A small but significant correlation was found between PCSK9 and HOMA-IR (R = 0.06, p = 0.01) in ELSA-Brasil, in the same order of magnitude than in IT-DIAB (R = 0.05; p = 0.49).

3.4. Association between baseline PCSK9 levels and changes in FPG

In IT-DIAB, the linear regression models showed no statistically significant association between baseline PCSK9 and FPG change at the end of follow-up: β (for 1 SD of FPG change/1 SD of baseline PCSK9) = −0.065 [-0.197; 0.067] (p = 0.34) and −0.038 [-0.17; 0.09] (p = 0.57), in univariable and multivariable analyses, respectively. Using the same approach in ELSA-Brasil, a significant positive association was found with a β (for 1 SD of FPG change/1 SD of baseline PCSK9) = 0.052 [0.006; 0.099] (p = 0.029) and 0.053 [0.006; 0.010] (p = 0.026), in univariable and multivariable analyses, respectively (Table 3). In a sensitivity analysis focused on the ELSA-Brasil population with prediabetes (n = 482), the observed association between baseline PCSK9 and FPG change was of greater magnitude but not significant: β = 0.076 [-0.058; 0.21] (p = 0.27) in univariable and 0.068 [-0.066; 0.202] (p = 0.30) in multivariable analysis.

4. Discussion

Mainly based on Mendelian randomization studies, a doubt has emerged about the potential diabetogenic risk of PCSK9 inhibitors. Here, we demonstrate that circulating PCSK9 concentrations are not significantly associated with the risk of NOD in two independent longitudinal cohorts, and most notably in individuals with prediabetes at high risk of conversion to type 2 diabetes. In the larger cohort (ELSA-Brasil), we even found that baseline PCSK9 levels were positively associated with a slight risk of worsening of glucose homeostasis, since (i) elevated PCSK9 levels were associated with an increased risk of conversion from normoglycemia to prediabetes or NOD and from prediabetes to NOD, and since (ii) there was a small but significant positive association between PCSK9 levels and FPG change during follow-up.

Our findings are consistent with the results of large cardiovascular outcomes randomized clinical trials (RCTs) with PCSK9 mAb that found that neither evolocumab nor alirocumab was associated with an increased risk of NOD, even if the duration of follow-up was short (< 3 years) [23,24]. Similar reassuring results were also obtained in pooled analyses of phase 3 trials [25,26]. Of note, a recent meta-analysis, including more than 68,000 participants in 20 RCTs with a median follow-up of 78 weeks, found that PCSK9 mAb modestly increased FPG (< 2.0 mg/dL) and A1C (< 0.05%) when compared with placebo, without increasing the risk of NOD [27].

Our results are also consistent with some pre-clinical findings regarding the molecular link between PCSK9 and diabetes [28]. Using transgenic mouse models, Da Dalt et al. recently demonstrated that intra-cellular PCSK9 rather that circulating PCSK9 is involved in the regulation of glucose homeostasis. Indeed, while total PCSK9 knockout mice exhibit impaired glucose tolerance and reduced insulin secretion, liver-specific PCSK9 knockout mice, that retain PCSK9 expression in extrahepatic organs and do not have detectable PCSK9 in their blood, show normal glycemic parameters [13]. In addition, we previously demonstrated that recombinant PCSK9 drastically down-regulates LDLR expression in human and mouse primary pancreatic islets [14]. While LDLR expression is increased in pancreatic islets from total PCSK9 knockout mice, there is no alteration in glucose-stimulated insulin secretion, even in the presence of high LDL concentrations [14]. This lack of deleterious effect of PCSK9-deficiency on insulin secretion *ex vivo* is associated with an absence of change in intra-cellular cholesterol content in the islets. Such a discrepancy between increased

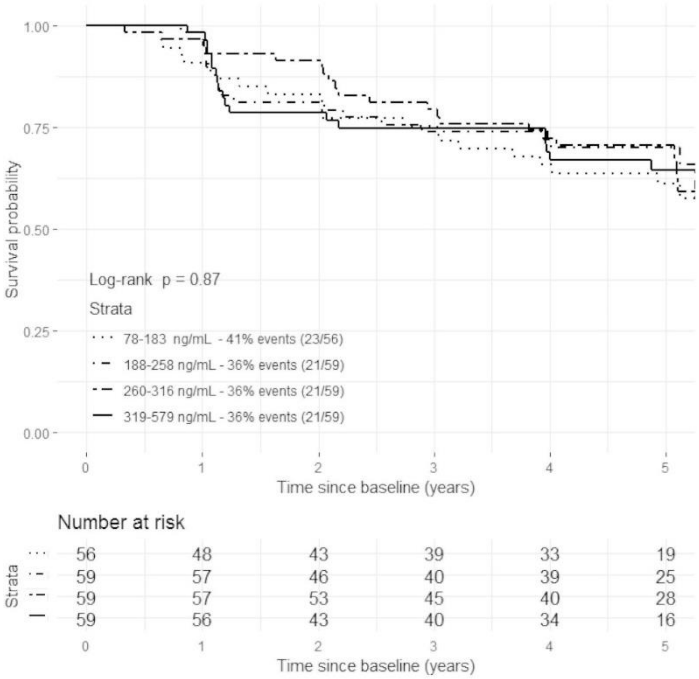


Fig. 1. Survival curves for New Onset Diabetes in the IT-DIAB cohort, according to baseline PCSK9 levels (groups created according to quartiles).
Dotted bar: lowest quartile for PCSK9 (78–183 ng/mL); dot and dash bar: second quartile (188–258 ng/mL); short and long dash: third quartile (260–316 ng/mL); solid bar: highest quartile (319–579 ng/mL).

LDLR expression and normal islets cholesterol content remains unclear. Given that PCSK9 is able to inhibit ATP binding cassette transporter A1 mediated cholesterol efflux in macrophages [29], it cannot be ruled out that PCSK9-deficiency may increase cholesterol efflux from the islets, a key factor of beta cell cholesterol homeostasis [30]. In addition, the effect of PCSK9-deficiency on glucose homeostasis may not be restricted to pancreatic islets [31]. For instance, individuals carrying the *PCSK9* R46L LOF variant have higher BMI, and increased body and liver fat mass percentage compared to controls [32]. The underlying mechanisms underpinning the potential increased risk of diabetes associated with PCSK9 deficiency or PCSK9 LOF variants remains to be investigated.

In the larger cohort (ELSA-Brasil), baseline plasma PCSK9 concentrations were positively associated with FPG change at 4-year. Even if the correlation is weak (an increase of about 0.05 SD (0.01–0.10) of FPG for 1 SD of PCSK9), this observation suggests that PCSK9 expression may be driven by a common feature of the metabolic syndrome such as insulin resistance. Previous transversal analyses in several

Table 2
Association between baseline characteristics and the risk of new onset diabetes during follow-up. Cox proportional hazard model, univariable and multivariable analyses. IT-DIAB cohort (N = 233).

	Univariable models (N_{max} = 233)		Multivariable model (N = 210)	
	HR ($CI_{95\%}$)	*p*-value	HR ($CI_{95\%}$)	*p*-value
Age (+1 SD)	1.06 [0.85; 1.33]	0.62	–	–
Sex (women/men)	1.11 [0.71; 1.75]	0.64	–	–
Waist circumference (+1 SD)	**1.46 [1.20; 1.79]** ***	**0.00021**	**1.45 [1.16; 1.82]** **	**0.0018**
Fasting plasma glucose (+1 SD)	**1.53 [1.24; 1.89]** ***	**< 0.0001**	**1.50 [1.19; 1.88]** **	**0.00038**
Total cholesterol (+1 SD)	0.90 [0.72; 1.12]	0.34	–	–
Triglycerides (+1 SD)	1.15 [0.96; 1.37]	0.12	**1.35 [1.01; 1.79]** [a]	**0.039**
LDL-C (+1 SD)	0.90 [0.72; 1.12]	0.34	–	–
HDL-C (+1 SD)	**0.77 [0.61; 0.98]** [a]	**0.033**	–	–
Non-HDL-C (+1 SD)	0.98 [0.79; 1.21]	0.83	–	–
PCSK9 (+1 SD)	0.93 [0.74; 1.15]	0.49	0.96 [0.76; 1.21]	0.73
Adiponectin (+1 SD)	**0.75 [0.57; 0.98]** [a]	**0.032**	–	–

Results obtained with Cox model based on the proportional hazard hypothesis. The main outcome was the occurrence of new onset diabetes, defined by a fasting PG ≥ 126 mg/dL and/or a PG ≥ 200 mg/dL after 2-h OGTT. Patients were right-censored after last follow-up, bariatric surgery, prescription of antidiabetic treatment or death, whatever came first. The baseline parameters included in the multivariable Cox model, before stepwise selection, were age, sex, waist circumference, triglycerides, LDL-C, HDL-C, adiponectin and PCSK9 levels, the latter being forced in the model.
HR (95% CI): Hazard-ratio with 95% confidence interval; PG: plasma glucose.
[a] *p*-value 0.01–0.05; ** *p*-value 0.001–0.01; ***p-value < 0.001.

cohorts highlighted a relationship between plasma PCSK9 levels and markers of glucose homeostasis. Higher plasma PCSK9 levels have been observed in patients with type 2 diabetes compared with non-diabetic individuals in most studies [33–37], but not all [38]. Circulating PCSK9 levels positively correlated with FPG, fasting plasma insulin, HOMA-IR, and A1C in several cohorts [33,39–41]. Moreover, plasma PCSK9 concentrations increased after short-term high-fructose diet and were negatively correlated with hepatic insulin sensitivity assessed by hyperinsulinemic-euglycemic clamp in healthy volunteers [42]. In agreement with these findings, a positive correlation between PCSK9 and HOMA-IR was found in ELSA-Brasil. Recently, some findings have raised the hypothesis for a potential link between PCSK9 and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease [43–45]. We recently reported that fatty liver index (FLI), an indirect marker of liver steatosis, is positively associated with a higher risk of conversion to NOD in IT-DIAB [46]. However, we found no significant correlation between FLI and plasma PCSK9 concentrations at baseline in IT-DIAB ($R = -0.07$, $p = 0.29$), in agreement with our previous data showing the lack of association between circulating PCSK9 and liver fat content assessed by MRI in patients with T2D [45].

One of the strengths of our study is that we obtained consistent results in two independent cohorts with different population sizes and ethnicities (n = 233 for IT-DIAB and n = 1751 for ELSA-Brasil), baseline plasma PCSK9 levels (higher in ELSA-Brasil than in IT-DIAB) and NOD risk levels (36.9% at 5-years for IT-DIAB and 3.9% at 4-years for ELSA-Brasil). In addition, plasma PCSK9 levels were assessed using a standardized protocol using the same assay throughout. Participants under statin therapy, an important confounding factor for PCSK9 levels, were also excluded [47]. Our study presents, however, some limitations. In both cohorts, there were no repeated measures of circulating PCSK9 to investigate its relationship with glucose homeostasis parameters during follow-up. The ELISA kit we used did not allow the measurement of multiples isoforms of PCSK9 (including phosphorylated Ser688 isoform) that might be differentially regulated [48]. In IT-DIAB, no systematic OGTT was performed during the annual visit, in addition to FPG and A1C, to diagnose NOD. In ELSA-Brasil there was no repeated measure of FPG between baseline and 4-years to draw survival curves as in IT-DIAB. The observational nature of our study only allows to draw some associations regarding PCSK9 role in conversion to type 2 diabetes, but no causation. Due to a potential lack of statistical power, the absence of a diabetogenic effect for PCSK9 in our exploratory study is not definitive evidence for the absence of a role for PCSK9 in glucose homeostasis.

In conclusion, this study assessed for the first time the association between circulating PCSK9 levels and the risk of diabetes in longitudinal analyses. Our data indicates that plasma PCSK9 levels do not predict the risk of conversion to type 2 diabetes in patients with prediabetes and are reassuring regarding the safety of PCSK9 mAb that specifically target the extra-cellular PCSK9 pathway.

Table 3
Association between baseline PCSK9 levels and changes in fasting PG between baseline and 4th year visit in ELSA-Brasil.

	β coefficient ($CI_{95\%}$)			
	Whole population		Population with prediabetes	
	Univariable(N_{max} = 1751)	Multivariable(n = 1720)	Univariable (N_{max} = 482)	Multivariable (n = 475)
Age (+1 SD)	**−0.07 [-0.11; -0.02]*** **	–	−0.13 [-0.26; 0.00]	–
Sex (women/men)	−0.03 [-0.13; 0.06]	–	−0.03 [-0.31; 0.25]	–
Waist circumference (+1 SD)	**0.10 [0.05; 0.14]*** **	**0.11 [0.06; 0.16]*** **	**0.14 [0.01; 0.28]* **	**0.18 [0.05; 0.32]** **
Fasting PG (+1 SD)	**−0.12 [-0.16; -0.07]*** **	**−0.14 [-0.19; -0.10]*** **	**−0.12 [-0.22; -0.02]* **	**−0.15 [-0.26; -0.04]** **
Total cholesterol (+1 SD)	0.00 [-0.05; 0.04]	–	0.01 [-0.13; 0.14]	–
Triglycerides (+1 SD)	**0.06 [0.01; 0.10]* **	–	0.07 [-0.05; 0.19]	–
LDL-C (+1 SD)	0.00 [-0.05; 0.05]	–	0.01 [-0.12; 0.15]	–
HDL-C (+1 SD)	**−0.08 [-0.13; -0.03]*** **	–	−0.13 [-0.27; 0.01]	–
Non-HDL-C (+1 SD)	0.03 [-0.02; 0.07]	–	0.06 [-0.08; 0.20]	–
ApoA1 (+1 SD)	**−0.08 [-0.13; -0.03]*** **	**−0.06 [-0.11; -0.01]* **	**−0.15 [-0.30; -0.01]* **	–
ApoB (+1 SD)	**0.06 [0.01; 0.10]* **	–	0.12 [-0.02; 0.26]	–
PCSK9 (+1 SD)	**0.05 [0.01; 0.10]* **	**0.05 [0.01; 0.10]* **	0.08 [-0.06; 0.21]	0.07 [-0.06; 0.21]

All quantitative variables were expressed using Z-score. Therefore, the β coefficient corresponds to the percentage of 1 SD variation of fasting PG for an increase of 1 SD of the studied parameter. β coefficients associated with a p-value < 0.05 are reported in bold. The following parameters were included in the multivariable regression model, before stepwise selection (α threshold for the selection: 0.05): baseline age, sex, waist circumference, fasting PG, triglycerides, LDL-C, HDL-C, and PCSK9 (ApoB, ApoA1 and total cholesterol were not included because of the obvious colinearity with other lipid parameters).
ApoA1: apolipoprotein A1; ApoB: apolipoprotein B; PG: plasma glucose; SD: standard deviation.

Financial support

IT-DIAB was funded by an ISI grant from OSEO-API, France to Genfit (coordinator of IT-Diab consortium) and CHU de Nantes, France. This work was supported by the French national project CHOPIN (CHolesterol Personalized INnovation) funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-RHUS-0007) and coordinated by the CHU of Nantes. VB is a recipient of a scholarship from La Région Réunion and the European Union (European Regional Development Fund INTERREG V) - RDS is a recipient of a scholarship from the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnologico (CNPq) process # 303734/2018-3.

Author contributions

SRM researched data and wrote the manuscript. MW performed the statistical analyses and wrote the manuscript. MP, CLM, AT, VB, BN RDS, IMB, and PAL researched data and reviewed/edited the manuscript. GL and BC supervised the work, wrote the manuscript and handled funding.

Declaration of competing interest

RDS has received research funding, honoraria, and consulting fees from Amgen, Merck, Astra Zeneca, Eli Lilly, Sanofi-Regeneron, Boehringher Ingelheim, Kowa, and Pfizer. GL has received research funding, honoraria, and consulting fees from Sanofi-Regeneron, Amgen, Affiris, Nyrada, and Pfizer. BC has received research funding, honoraria and consulting fees from Sanofi-Regeneron Pfizer, Amgen, and MSD. All other authors have nothing to disclose.

Acknowledgements

We thank Yassine Zaïr, Vincent Jacquin, Marina Blanchard, Béatrice Lamour and Violette Dierry (CIC Endocrino-Nutrition 1413 INSERM, CHU Nantes); Gilles Breton and Charlotte Authier (Centre d'examens de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie de Loire-Atlantique, France) for their help in data collection. We thank the biological resource centre for biobanking (CHU Nantes, Hôtel Dieu, Centre de ressources biologiques (CRB), Nantes, F-44093, France (BRIF: BB-0033-00040)).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.027.

References

[1] P.M. Ridker, E. Danielson, F.A.H. Fonseca, J. Genest, A.M. Gotto, J.J.P. Kastelein, W. Koenig, P. Libby, A.J. Lorenzatti, J.G. MacFadyen, B.G. Nordestgaard, J. Shepherd, J.T. Willerson, R.J. Glynn, Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein, N. Engl. J. Med. 359 (2008) 2195–2207, https://doi.org/10.1056/NEJMoa0807646.

[2] N. Sattar, D. Preiss, H.M. Murray, P. Welsh, B.M. Buckley, A.J.M. de Craen, S.R.K. Seshasai, J.J. McMurray, D.J. Freeman, J.W. Jukema, P.W. Macfarlane, C.J. Packard, D.J. Stott, R.G. Westendorp, J. Shepherd, B.R. Davis, S.L. Pressel, R. Marchioli, R.M. Marfisi, A.P. Maggioni, L. Tavazzi, G. Tognoni, J. Kjekshus, T.R. Pedersen, T.J. Cook, A.M. Gotto, M.B. Clearfield, J.R. Downs, H. Nakamura, Y. Ohashi, K. Mizuno, K.K. Ray, I. Ford, Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials, Lancet 375 (2010) 735–742, https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61965-6.

[3] D. Preiss, S.R.K. Seshasai, P. Welsh, S.A. Murphy, J.E. Ho, D.D. Waters, D.A. DeMicco, P. Barter, C.P. Cannon, M.S. Sabatine, E. Braunwald, J.J.P. Kastelein, J.A. de Lemos, M.A. Blazing, T.R. Pedersen, M.J. Tikkanen, N. Sattar, K.K. Ray, Risk of incident diabetes with intensive-dose compared with moderate-dose statin therapy: a meta-analysis, J. Am. Med. Assoc. 305 (2011) 2556–2564, https://doi.org/10.1001/jama.2011.860.

[4] E.P. Navarese, A. Buffon, F. Andreotti, M. Kozinski, N. Welton, T. Fabiszak, S. Caputo, G. Grzesk, A. Kubica, I. Swiatkiewicz, A. Sukiennik, M. Kelm, S. De Servi, J. Kubica, Meta-analysis of impact of different types and doses of statins on new-onset diabetes mellitus, Am. J. Cardiol. 111 (2013) 1123–1130, https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2012.12.037.

[5] C.R. Dormuth, K.B. Filion, J.M. Paterson, M.T. James, G.F. Teare, C.B. Raymond, E. Rahme, H. Tamim, L. Lipscombe, Canadian Network for Observational Drug Effect Studies Investigators, Higher potency statins and the risk of new diabetes: multicentre, observational study of administrative databases, BMJ 348 (2014) g3244, , https://doi.org/10.1136/bmj.g3244.

[6] P. Kohli, D.D. Waters, R. Nemr, B.J. Arsenault, M. Messig, D.A. DeMicco, R. Laskey, J.J.P. Kastelein, Risk of new-onset diabetes and cardiovascular risk reduction from high-dose statin therapy in pre-diabetics and non-pre-diabetics: an analysis from TNT and IDEAL, J. Am. Coll. Cardiol. 65 (2015) 402–404, https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.10.053.

[7] D.I. Swerdlow, D. Preiss, Genetic insights into statin-associated diabetes risk, Curr. Opin. Lipidol. 27 (2016) 125–130, https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000272.

[8] J. Besseling, J.J.P. Kastelein, J.C. Defesche, B.A. Hutten, G.K. Hovingh, Association between familial hypercholesterolemia and prevalence of type 2 diabetes mellitus, J. Am. Med. Assoc. 313 (2015) 1029–1036, https://doi.org/10.1001/jama.2015.1206.

[9] G. Lambert, B. Sjouke, B. Choque, J.J.P. Kastelein, G.K. Hovingh, The PCSK9 decade, J. Lipid Res. 53 (2012) 2515–2524, https://doi.org/10.1194/jlr.R026658.

[10] E.F. Villard, A. Thedrez, J. Blankenstein, M. Croyal, T.-T.-T. Tran, B. Poirier, J.-C. Le Bail, S. Illiano, E. Nobécourt, M. Krempf, D.J. Blom, A.D. Marais, P. Janiak, A.J. Muslin, E. Guillot, G. Lambert, PCSK9 modulates the secretion but not the cellular uptake of lipoprotein(a) ex vivo: an effect blunted by alirocumab, JACC Basic Transl Sci 1 (2016) 419–427, https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.06.006.

[11] A. Thedrez, D.J. Blom, S. Ramin-Mangata, V. Blanchard, M. Croyal, K. Chemello, B. Nativel, M. Pichelin, B. Cariou, S. Bourane, L. Tang, M. Farnier, F.J. Raal, G. Lambert, Homozygous familial hypercholesterolemia patients with identical mutations variably express the LDLR (Low-Density lipoprotein receptor): implications for the efficacy of evolocumab, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 38 (2018) 592–598, https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310217.

[12] M. Mbikay, F. Sirois, J. Mayne, G.-S. Wang, A. Chen, T. Dewpura, A. Prat, N.G. Seidah, M. Chretien, F.W. Scott, PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities, FEBS Lett. 584 (2010) 701–706, https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.018.

[13] L. Da Dalt, M. Ruscica, F. Bonacina, G. Balzarotti, A. Dhyani, E. Di Cairano, A. Baragetti, L. Arnaboldi, S. De Metrio, F. Pellegatta, L. Grigore, M. Botta, C. Macchi, P. Uboldi, C. Perego, A.L. Catapano, G.D. Norata, PCSK9 deficiency reduces insulin secretion and promotes glucose intolerance: the role of the low-density lipoprotein receptor, Eur. Heart J. (2018), https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy357.

[14] C. Langhi, C. Le May, V. Gmyr, B. Vandewalle, J. Kerr-Conte, M. Krempf, F. Pattou, P. Costet, B. Cariou, PCSK9 is expressed in pancreatic delta-cells and does not alter insulin secretion, Biochem. Biophys. Res. Commun. 390 (2009) 1288–1293, https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.138.

[15] L.A. Lotta, S.J. Sharp, S. Burgess, J.R.B. Perry, I.D. Stewart, S.M. Willems, J. Luan, E. Ardanaz, L. Arriola, B. Balkau, H. Boeing, P. Deloukas, N.G. Forouhi, P.W. Franks, S. Grioni, R. Kaaks, T.J. Key, C. Navarro, P.M. Nilsson, K. Overvad, D. Palli, S. Panico, J.-R. Quirós, E. Riboli, O. Rolandsson, C. Sacerdote, E.C. Salamanca, N. Slimani, A.M. Spijkerman, A. Tjonneland, R. Tumino, D.L. van der A, Y.T. van der Schouw, M.I. McCarthy, I. Barroso, S. O'Rahilly, D.B. Savage, N. Sattar, C. Langenberg, R.A. Scott, N.J. Wareham, Association between low-density lipoprotein cholesterol-lowering genetic variants and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis, J. Am. Med. Assoc. 316 (2016) 1383–1391, https://doi.org/10.1001/jama.2016.14568.

[16] A.F. Schmidt, D.I. Swerdlow, M.V. Holmes, R.S. Patel, Z. Fairhurst-Hunter, D.M. Lyall, F.P. Hartwig, B.L. Horta, E. Hyppönen, C. Power, M. Moldovan, E. van Iperen, G.K. Hovingh, I. Demuth, K. Norman, E. Steinhagen-Thiessen, J. Demuth, L. Bertram, T. Liu, S. Coassin, J. Willeit, S. Kiechl, K. Willeit, D. Mason, J. Wright, R. Morris, G. Wanamethee, P. Whincup, Y. Ben-Shlomo, S. McLachlan, J.F. Price, M. Kivimaki, C. Welch, A. Sanchez-Galvez, P. Marques-Vidal, A. Nicolaides, A.G. Panayiotou, N.C. Onland-Moret, Y.T. van der Schouw, G. Matullo, G. Fiorito, S. Guarrera, C. Sacerdote, N.J. Wareham, C. Langenberg, R. Scott, J. Luan, M. Bobak, S. Malyutina, A. Pająk, R. Kubinova, A. Tamosiunas, H. Pikhart, L.L.N. Husemoen, N. Grarup, O. Pedersen, T. Hansen, A. Linneberg, K.S. Simonsen, J. Cooper, S.E. Humphries, M. Brilliant, T. Kitchner, H. Hakonarson, D.S. Carrell, C.A. McCarty, H.L. Kirchner, E.B. Larson, D.R. Crosslin, M. de Andrade, D.M. Roden, J.C. Denny, C. Carty, S. Hancock, J. Attia, E. Holliday, M. O'Donnell, S. Yusuf, M. Chong, G. Pare, P. van der Harst, M.A. Said, R.N. Eppinga, N. Verweij, H. Snieder, LifeLines Cohort study group, T. Christen, D.O. Mook-Kanamori, S. Gustafsson, L. Lind, E. Ingelsson, R. Pazoki, O. Franco, A. Hofman, A. Uitterlinden, A. Dehghan, A. Teumer, S. Baumeister, M. Dörr, M.M. Lerch, U. Völker, H. Völzke, J. Ward, J.P. Pell, D.J. Smith, T. Meade, A.H. Maitland-van der Zee, E.V. Baranova, R. Young, I. Ford, A. Campbell, S. Padmanabhan, M.L. Bots, D.E. Grobbee, P. Froguel, D. Thuillier, B. Balkau, A. Bonnefond, B. Cariou, M. Smart, Y. Bao, M. Kumari, A. Mahajan, P.M. Ridker, D.I. Chasman, A.P. Reiner, L.A. Lange, M.D. Ritchie, F.W. Asselbergs, J.-P. Casas, B.J. Keating, D. Preiss, A.D. Hingorani, UCLEB consortium, N. Sattar, PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a mendelian randomisation study, Lancet Diabetes Endocrinol 5 (2017) 97–105, https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30396-5.

[17] B.A. Ference, J.G. Robinson, R.D. Brook, A.L. Catapano, M.J. Chapman, D.R. Neff, S. Voros, R.P. Giugliano, G. Davey Smith, S. Fazio, M.S. Sabatine, Variation in PCSK9 and HMGCR and risk of cardiovascular disease and diabetes, N. Engl. J. Med. 375 (2016) 2144–2153, https://doi.org/10.1056/NEJMoa1604304.

[18] E.M.L. Aquino, S.M. Barreto, I.M. Bensenor, M.S. Carvalho, D. Chor, B.B. Duncan, P.A. Lotufo, J.G. Mill, M.D.C. Molina, E.L.A. Mota, V.M.A. Passos, M.I. Schmidt, M. Szklo, Brazilian longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil): objectives and design, Am. J. Epidemiol. 175 (2012) 315–324, https://doi.org/10.1093/aje/kwr294.

[19] M.I. Schmidt, P.A. Bracco, J.S. Yudkin, I.M. Bensenor, R.H. Griep, S.M. Barreto, C.D. Castilhos, B.B. Duncan, Intermediate hyperglycaemia to predict progression to type 2 diabetes (ELSA-Brasil): an occupational cohort study in Brazil, Lancet Diabetes Endocrinol 7 (2019) 267–277, https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30058-0.

[20] D.R. Matthews, J.P. Hosker, A.S. Rudenski, B.A. Naylor, D.F. Treacher, R.C. Turner, Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man, Diabetologia 28 (1985) 412–419.

[21] M. Croyal, F. Fall, M. Krempf, A. Thédrez, K. Ouguerram, V. Ferchaud-Roucher, A. Aguesse, S. Billon-Crossouard, P. Mata, R. Alonso, G. Lambert, E. Nobécourt, Plasma PCSK9 measurement by liquid chromatography-Tandem mass spectrometry and comparison with conventional ELISA, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 1044–1045 (2017) 24–29, https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.12.040.

[22] W. Sauerbrei, C. Meier-Hirmer, A. Benner, P. Royston, Multivariable regression model building by using fractional polynomials: description of SAS, STATA and R programs, Comput. Stat. Data Anal. 50 (2006) 3464–3485, https://doi.org/10.1016/j.csda.2005.07.015.

[23] M.S. Sabatine, R.P. Giugliano, A.C. Keech, N. Honarpour, S.D. Wiviott, S.A. Murphy, J.F. Kuder, H. Wang, T. Liu, S.M. Wasserman, P.S. Sever, T.R. Pedersen, FOURIER steering committee and investigators, evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease, N. Engl. J. Med. 376 (2017) 1713–1722, https://doi.org/10.1056/NEJMoa1615664.

[24] G.G. Schwartz, P.G. Steg, M. Szarek, D.L. Bhatt, V.A. Bittner, R. Diaz, J.M. Edelberg, S.G. Goodman, C. Hanotin, R.A. Harrington, J.W. Jukema, G. Lecorps, K.W. Mahaffey, A. Moryusef, R. Pordy, K. Quintero, M.T. Roe, W.J. Sasiela, J.-F. Tamby, P. Tricoci, H.D. White, A.M. Zeiher, Alirocumab and cardiovascular outcomes after acute coronary syndrome, N. Engl. J. Med. 379 (2018) 2097–2107, https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801174.

[25] H.M. Colhoun, H.N. Ginsberg, J.G. Robinson, L.A. Leiter, D. Müller-Wieland, R.R. Henry, B. Cariou, M.T. Baccara-Dinet, R. Pordy, L. Merlet, R.H. Eckel, No effect of PCSK9 inhibitor alirocumab on the incidence of diabetes in a pooled analysis from 10 ODYSSEY Phase 3 studies, Eur. Heart J. 37 (2016) 2981–2989, https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw292.

[26] N. Sattar, P.P. Toth, D.J. Blom, M.J. Koren, H. Soran, M. Uhart, M. Elliott, M. Cyrille, R. Somaratne, D. Preiss, Effect of the proprotein convertase subtilisin/

kexin type 9 inhibitor evolocumab on glycemia, body weight, and new-onset diabetes mellitus, Am. J. Cardiol. 120 (2017) 1521–1527, https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2017.07.047.

[27] L.S.F. de Carvalho, A.M. Campos, A.C. Sposito, Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibitors and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis with over 96,000 patient-years, Diabetes Care 41 (2018) 364–367, https://doi.org/10.2337/dc17-1464.

[28] W. Dijk, B. Cariou, Efficacy and safety of proprotein convertase subtilisin/kexin 9 inhibitors in people with diabetes and dyslipidaemia, Diabetes Obes. Metab. 21 (2019) 39–51, https://doi.org/10.1111/dom.13636.

[29] M.P. Adorni, E. Cipollari, E. Favari, I. Zanotti, F. Zimetti, A. Corsini, C. Ricci, F. Bernini, N. Ferri, Inhibitory effect of PCSK9 on Abca1 protein expression and cholesterol efflux in macrophages, Atherosclerosis 256 (2017) 1–6, https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.11.019.

[30] L.R. Brunham, J.K. Kruit, T.D. Pape, J.M. Timmins, A.Q. Reuwer, Z. Vasanji, B.J. Marsh, B. Rodrigues, J.D. Johnson, J.S. Parks, C.B. Verchere, M.R. Hayden, Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment, Nat. Med. 13 (2007) 340–347, https://doi.org/10.1038/nm1546.

[31] R.M. Stoekenbroek, G. Lambert, B. Cariou, G.K. Hovingh, Inhibiting PCSK9 - biology beyond LDL control, Nat. Rev. Endocrinol. 15 (2018) 52–62, https://doi.org/10.1038/s41574-018-0110-5.

[32] A. Baragetti, G. Balzarotti, L. Grigore, F. Pellegatta, U. Guerrini, G. Pisano, A.L. Fracanzani, S. Fargion, G.D. Norata, A.L. Catapano, PCSK9 deficiency results in increased ectopic fat accumulation in experimental models and in humans, Eur J Prev Cardiol 24 (2017) 1870–1877, https://doi.org/10.1177/2047487317724342.

[33] S.G. Lakoski, T.A. Lagace, J.C. Cohen, J.D. Horton, H.H. Hobbs, Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels, J. Clin. Endocrinol. Metab. 94 (2009) 2537–2543, https://doi.org/10.1210/jc.2009-0141.

[34] Y. Nekaies, B. Baudin, M. Sakly, N. Attia, Plasma proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is associated with Lp(a) in type 2 diabetic patients, Atherosclerosis 241 (2015) e102, https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.356.

[35] D. Ibarretxe, J. Girona, N. Plana, A. Cabré, R. Ferré, N. Amigó, S. Guaita, R. Mallol, M. Heras, L. Masana, Circulating PCSK9 in patients with type 2 diabetes and related metabolic disorders, Clín. Investig. Arterioscler. 28 (2016) 71–78, https://doi.org/10.1016/j.arteri.2015.11.001.

[36] B. Cariou, M. Le Bras, C. Langhi, C. Le May, B. Guyomarc'h-Delasalle, M. Krempf, P. Costet, Association between plasma PCSK9 and gamma-glutamyl transferase levels in diabetic patients, Atherosclerosis 211 (2010) 700–702, https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.04.015.

[37] B.J. Arsenault, F. Petrides, F. Tabet, W. Bao, G.K. Hovingh, S.M. Boekholdt, S. Ramin-Mangata, O. Meilhac, D. DeMicco, K.-A. Rye, D.D. Waters, J.J.P. Kastelein, P. Barter, G. Lambert, Effect of atorvastatin, cholesterol ester transfer protein inhibition, and diabetes mellitus on circulating proprotein subtilisin kexin type 9 and lipoprotein(a) levels in patients at high cardiovascular risk, J Clin Lipidol 12 (2018) 130–136, https://doi.org/10.1016/j.jacl.2017.10.001.

[38] M.C.G.J. Brouwers, J.S. Troutt, M.M.J. van Greevenbroek, I. Ferreira, E.J. Feskens, C.J.H. van der Kallen, N.C. Schaper, C.G. Schalkwijk, R.J. Konrad, C.D.A. Stehouwer, Plasma proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is not altered in subjects with impaired glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus, but its relationship with non-HDL cholesterol and apolipoprotein B may be modified by type 2 diabetes mellitus: the CODAM study, Atherosclerosis 217 (2011) 263–267, https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.03.023.

[39] A. Baass, G. Dubuc, M. Tremblay, E.E. Delvin, J. O'Loughlin, E. Levy, J. Davignon, M. Lambert, Plasma PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in a population-based sample of children and adolescents, Clin. Chem. 55 (2009) 1637–1645, https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.126987.

[40] Q. Cui, X. Ju, T. Yang, M. Zhang, W. Tang, Q. Chen, Y. Hu, J.V. Haas, J.S. Troutt, R.T. Pickard, R. Darling, R.J. Konrad, H. Zhou, G. Cao, Serum PCSK9 is associated with multiple metabolic factors in a large Han Chinese population, Atherosclerosis 213 (2010) 632–636, https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.09.027.

[41] C. Werner, M.M. Hoffmann, K. Winkler, M. Böhm, U. Laufs, Risk prediction with proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in patients with stable coronary disease on statin treatment, Vasc. Pharmacol. 62 (2014) 94–102, https://doi.org/10.1016/j.vph.2014.03.004.

[42] B. Cariou, C. Langhi, M. Le Bras, M. Bortolotti, K.-A. Lê, F. Theytaz, C. Le May, B. Guyomarc'h-Delasalle, Y. Zaïr, R. Kreis, C. Boesch, M. Krempf, L. Tappy, P. Costet, Plasma PCSK9 concentrations during an oral fat load and after short term high-fat, high-fat high-protein and high-fructose diets, Nutr. Metab. 10 (2013) 4, https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-4.

[43] P.F. Lebeau, J.H. Byun, K. Platko, M.E. MacDonald, S.V. Poon, M. Faiyaz, N.G. Seidah, R.C. Austin, Diet-induced hepatic steatosis abrogates cell-surface LDLR by inducing de novo PCSK9 expression in mice, J. Biol. Chem. 294 (2019) 9037–9047, https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008094.

[44] M. Ruscica, N. Ferri, C. Macchi, M. Meroni, C. Lanti, C. Ricci, M. Maggioni, A.L. Fracanzani, S. Badiali, S. Fargion, P. Magni, L. Valenti, P. Dongiovanni, Liver fat accumulation is associated with circulating PCSK9, Ann. Med. 48 (2016) 384–391, https://doi.org/10.1080/07853890.2016.1188328.

[45] M. Wargny, P.-H. Ducluzeau, J.-M. Petit, C. Le May, S. Smati, L. Arnaud, M. Pichelin, B. Bouillet, A. Lannes, O. Blanchet, P. Lefebvre, S. Francque, L. Van Gaal, B. Staels, B. Vergès, J. Boursier, B. Cariou, Circulating PCSK9 levels are not associated with the severity of hepatic steatosis and NASH in a high-risk population, Atherosclerosis 278 (2018) 82–90, https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.09.008.

[46] M. Wargny, S. Smati, M. Pichelin, E. Bigot-Corbel, C. Authier, V. Dierry, Y. Zaïr, V. Jacquin, S. Hadjadj, J. Boursier, B. Cariou, Fatty liver index is a strong predictor of changes in glycemic status in people with prediabetes: the IT-DIAB study, PLoS One 14 (2019) e0221524, , https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221524.

[47] P. Costet, M.M. Hoffmann, B. Cariou, B. Guyomarc'h Delasalle, T. Konrad, K. Winkler, Plasma PCSK9 is increased by fenofibrate and atorvastatin in a non-additive fashion in diabetic patients, Atherosclerosis 212 (2010) 246–251, https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.05.027.

[48] M.-S. Gauthier, Z. Awan, A. Bouchard, J. Champagne, S. Tessier, D. Faubert, K. Chabot, P.Y. Garneau, R. Rabasa-Lhoret, N.G. Seidah, P.M. Ridker, J. Genest, B. Coulombe, Posttranslational modification of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 is differentially regulated in response to distinct cardiometabolic treatments as revealed by targeted proteomics, J Clin Lipidol 12 (2018) 1027–1038, https://doi.org/10.1016/j.jacl.2018.03.092.

SUPPLEMENTARY DATA

Circulating Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9 (PCSK9) levels are not associated with the conversion to type-2-diabetes

Stéphane Ramin-Mangata et al.

SUPPLEMENTARY TABLE 1 - Baseline characteristics of the population according to diabetes status at the last visit

Supplemental Table 1. Baseline characteristics of the population according to diabetes status at last visit

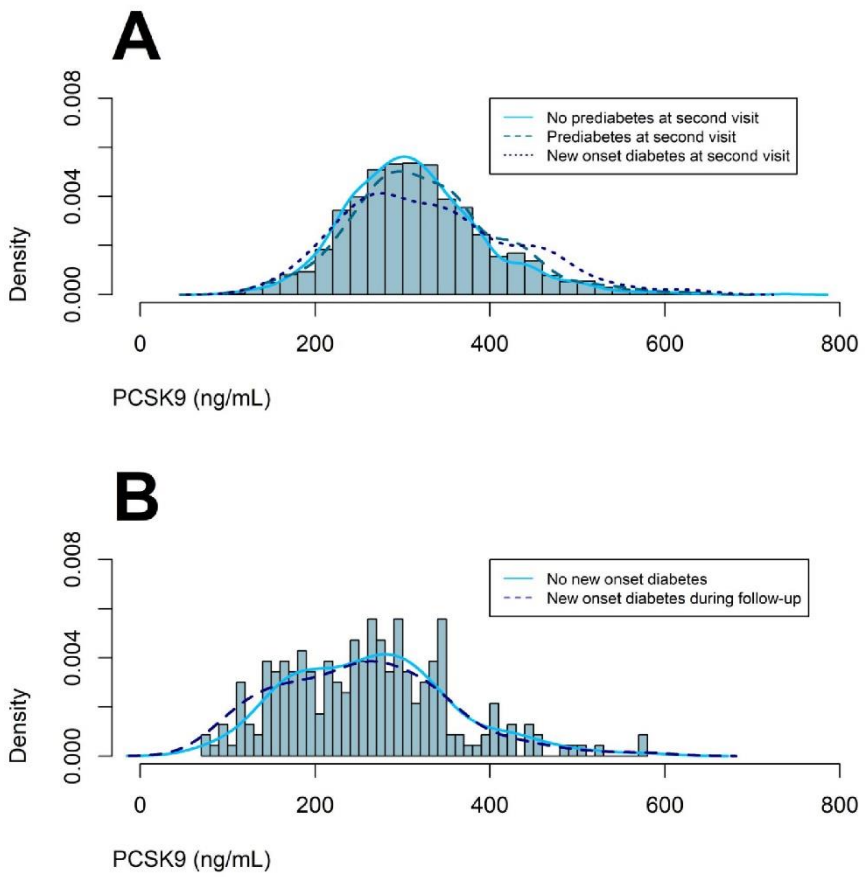
	IT-DIAB (n = 233)			ELSA-Brasil (n = 1751)		
Finale diabetes status	**NOD-FREE (N = 147)**	**NOD (N = 86)**	***P*-value**	**NOD-FREE (N = 1682)**	**NOD (N = 69)**	***P*-value**
Clinical characteristics						
Age (years)	55.8 ± 10.2	57.1 ± 9.0	0.31	50.4 ± 8.5	51.0 ± 7.4	0.57
Women	46 (31.3 %)	30 (34.9 %)	0.66	855 (50.8 %)	33 (47.8 %)	0.71
BMI (kg/m²)	**28.7 ± 6.4**	**31.2 ± 5.9**	**0.0035**	**26.9 ± 4.6**	**29.1 ± 5.3**	**<0.0001**
Waist circumference (cm)	**95.8 ± 13.7**	**101.9 ± 14.6**	**0.0015**	**89.1 ± 11.6**	**94.7 ± 13.3**	**<0.0001**
Postmenopausal women	NA	NA	-	372 (43.5 %)	12 (36.4 %)	0.48
Lipid profile						
Total cholesterol (mg/dL)	224.3 ± 38.2	220.9 ± 39.9	0.52	215.6 ± 38.4	222.1 ± 39.8	0.16
Triglycerides (mg/dL)	126.6 ± 80.6	144.1 ± 75.3	0.11	**131.6 ± 83.4**	**168.1 ± 90.7**	**0.0004**
LDL-c (mg/dL)	144.4 ± 34.8	141.2 ± 35.1	0.50	133.9 ± 33.0	137.1 ± 34.0	0.43
HDL-c (mg/dL)	**54.6 ± 16.2**	**50.3 ± 13.4**	**0.038**	**55.7 ± 13.8**	**51.6 ± 16.9**	**0.016**
Non-HDL-c (mg/dL)	169.7 ± 40.9	169.7 ± 39.3	0.99	**159.8 ± 37.1**	**170.5 ± 36.4**	**0.019**
ApoA1 (mg/dL)	NA	NA	-	**156.8 ± 21.9**	**151.2 ± 26.5**	**0.04**
ApoB (mg/dL)	NA	NA	-	**106.9 ± 23.0**	**114.0 ± 23.7**	**0.013**
PCSK9 (ng/mL)	264.2 ± 93.5	253.6 ± 97.5	0.41	318.1 ± 81.9	331.8 ± 96.8	0.18
Glucose homeostasis						
Fasting PG (mg/dL)	**114.9 ± 3.9**	**117.0 ± 4.8**	**0.0004**	**100.9 ± 6.0**	**105.1 ± 6.6**	**<0.0001**
PG 2h after OGTT (mg/dL)	NA	NA	-	121.8 ± 24.7	142.3 ± 26.2	**<0.0001**
HbA_{1c} (%)	**5.7 ± 0.4**	**6.0 ± 0.5**	**<0.0001**	**5.3 ± 0.5**	**5.4 ± 0.5**	**0.011**
HbA_{1c} (mmol/mol)	**39.1 ± 4.4**	**42.2 ± 5.0**	**<0.0001**	**34.0 ± 5.9**	**35.9 ± 5.5**	**0.011**
Fasting insulin (mUI/L)	**11.8 ± 8**	**17.2 ± 10.5**	**<0.0001**	**11.8 ± 7.6**	**16.1 ± 12.5**	**<0.0001**
Insulin after OGTT (mUI/L)	NA	NA	-	**81.6 ± 67.9**	**121.8 ± 85.2**	**<0.0001**
HOMA-β	**73.2 (51.8-100.1)**	**87.6 (58.7-145.4)**	**0.021**	**113.7 ± 73.9**	**140.2 ± 112.3**	**0.0045**
HOMA-IR	**3.3 ± 2.3**	**5.1 ± 3.1**	**<0.0001**	**2.6 (1.8-3.7)**	**3.4 (2.1-5.3)**	**0.0004**
Adiponectin (µg/mL)	**3.6 (2.6-5.2)**	**3 (2-4.3)**	**0.0086**	NA	NA	-

Data are presented using size (%), mean ± standard deviation, or median (25th -75th centiles). ApoA1: Apolipoprotein A1; ApoB: Apolipoprotein B; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance; NA: data not available; OGTT: oral-glucose tolerance test; PG: plasma glucose.

SUPPLEMENTAL TABLE 2 - IT-DIAB and ELSA-BRASIL studies, main eligibility criteria

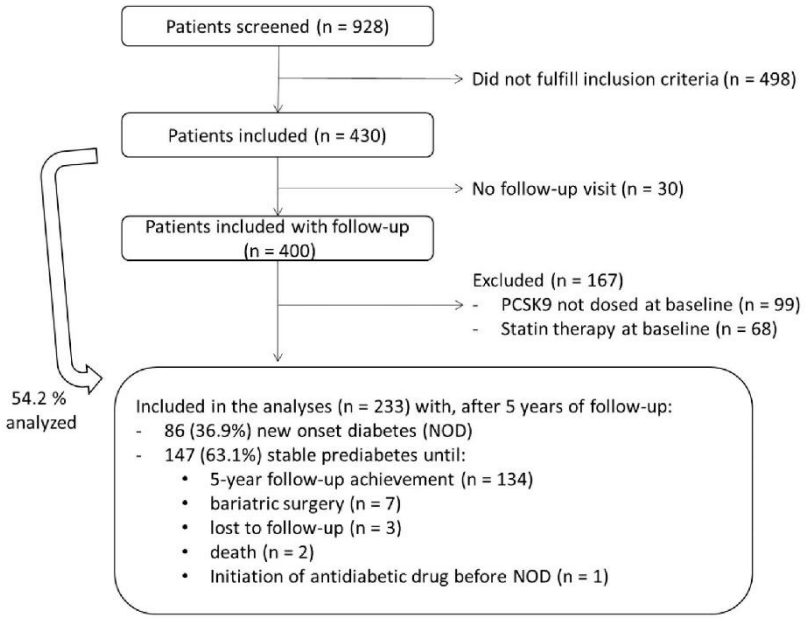
Supplemental Table 2: IT-DIAB and ELSA-BRASIL studies, main eligibility criteria		
	IT-DIAB	**ELSA-BRASIL**
Inclusion criteria	- Men or women aged 18 or higher - Insured under the national health insurance scheme - Who gave written consent for the study - Who presented a impaired fasting glucose defined as fasting plasma glucose (FPG) ≥110 mg/dL and < 126 mg/dL at baseline visit	- Men or women aged 35 to 74 years - To be followed in the Sao Paulo center - Being randomly selected (1751/5060 participants)
Non-inclusion criteria	- History of treatment with oral anti-diabetic agent or insulin (except for gestational diabetes) - Severe coagulation disorders or thrombocytopenia - Severe renal insufficiency (defined using MDRD equation as eGFR<30 mL/min.1.73m²) - Severe liver impairment (prothrombin ratio <50%) - Severe psychiatric disorders - Alcohol abuse estimated >30 g/day - Patient's opposition or inability to follow the study at least 5 years.	- History of diabetes, defined as FPG ≥ 126 mg/dL and/or 2-hour post-load glucose ≥ 200 mg/dL and/or history of treatment with oral anti-diabetic agents or insulin - Cardiovascular, renal or hepatic diseases (self-reported history)
Exclusion criteria applied to this ancillary study	- Patient lost to follow-up after first visit (no second measure of FPG) - Concomitant statin therapy at baseline - Baseline PCSK9 levels not dosed	- No concomitant prescription of lipid-lowering agent

SUPPLEMENTARY FIGURE 1 - PCSK9 distribution at baseline according to final diabetes status in (A) ELSA-Brasil and (B) IT-DIAB cohorts



The blue vertical bars represent PCSK9 distribution in the whole population. (**A**) curves are plotted for PCSK9 distribution according to final diabetes status: no diabetes (solid), prediabetes (dashed) or new onset diabetes (dots). **(B)** curves are plotted for PCSK9 distribution according to final diabetes status: no new onset diabetes (solid) or new onset diabetes (dashed).

SUPPLEMENTARY FIGURE 2 - IT-DIAB study flow-chart



NOD: New Onset Diabetes

Discussion et perspectives

Dans cette seconde étude, les concentrations plasmatiques de PCSK9 étaient plus élevées dans la cohorte brésilienne (ELSA-Brasil) que dans la cohorte française (IT-DIAB). Nous avons trouvé dans ces 2 cohortes indépendantes que PCSK9 est corrélé de façon positive à des paramètres métaboliques comme le cholestérol total, le LDL-C et les TG confirmant les données de la littérature. En ce qui concerne les paramètres glucidiques, les concentrations basses de PCSK9 ne sont pas associées de façon significative au risque de nouveau cas de DT2 après 4 ou 5 ans. En revanche, dans la cohorte ELSA-Brasil, les niveaux plasmatiques de PCSK9 sont positivement associés avec une altération de l'homéostasie glucidique. En effet, il y a une association entre les niveaux de PCSK9 et l'indice d'insulinorésistance HOMA-IR ainsi qu'une association entre les niveaux de PCSK9 à l'inclusion et l'augmentation de la glycémie à jeun au bout de 4 ans.

Dans notre première étude, PCSK9 était également corrélé positivement avec l'indice de résistance à l'insuline HOMA-IR (0,18, $p<0,0001$). Les corrélations obtenues dans les cohortes ELSA-Brasil et IT-DIAB (respectivement $r=0,06$, $p=0,01$ et $r=0,05$, $p=0,49$) sont moins étendues que celle obtenue dans la cohorte Illuminate. Néanmoins, les corrélations observées entre ces paramètres dans ELSA-Brasil et IT-DIAB vont dans le même sens que celles observées dans Illuminate. Des études antérieures ont également rapporté une corrélation positive ente PCSK9 et l'HOMA-IR (Baass et al., 2009; Lakoski et al., 2009). La glycémie à jeun et l'HbA1c corrèlent aussi de façon positive avec PCSK9 comme dans les études des Pr. Cao et Laufs (Cui et al., 2010; Werner et al., 2014).

Nous avons trouvé dans cette deuxième étude que les niveaux circulants de PCSK9 ne sont pas prédictifs de la survenue du DT2. Notre étude, sur une durée de 5 ans, renforce les conclusions des données d'études cliniques randomisées obtenues sur de plus courtes périodes qui ont montré que l'inhibition de PCSK9 au moyen d'anticorps monoclonaux n'était pas associée avec

le risque de développer un DT2 (Sabatine et al., 2017a; Schwartz et al., 2018). Des études de phase 3 regroupées ainsi que des méta-analyses ont fait ressortir des résultats comparables (Colhoun et al., 2016; Sattar et al., 2017; de Carvalho et al., 2018). Les premières explications de l'association entre PCSK9 et les paramètres glucidiques au niveau préclinique proviennent d'une étude réalisée par l'équipe du Pr. Norata. Ils ont observé que des souris dont le gène *Pcsk9* a été inactivé totalement présentaient une dérégulation de la glycémie tandis que des souris dont *Pcsk9* a été inactivé uniquement au niveau hépatique présentaient une régulation de la glycémie normale. L'inactivation de *Pcsk9* au niveau hépatique engendre une chute de la concentration de PCSK9 circulante mais pas intra-tissulaire au niveau des tissus extra-hépatiques comme le pancréas. Ainsi, en utilisant des souris knockout conditionnel pour *Pcsk9*, ils ont pu mettre en évidence que c'est principalement la forme intra-pancréatique de PCSK9 qui est impliquée dans la régulation de la glycémie et non la forme circulante (Da Dalt et al., 2018).

Une des forces de notre étude réside dans le fait d'obtenir des résultats similaires dans 2 cohortes avec des populations de tailles, d'ethnies et de concentration en PCSK9 différentes. Un autre avantage est l'absence de facteur confondant comme le traitement par une statine qui influe sur les niveaux de PCSK9. Les dosages de PCSK9 ont été réalisés par le même expérimentateur en suivant un protocole standardisé et en utilisant la même technique de dosage immunologique. Cependant, notre étude comporte quelques limites. Les individus d'ELSA-Brasil ont été vus 2 fois, au moment de l'inclusion et à la fin de l'étude contrairement aux patients d'IT-DIAB qui ont bénéficié d'un suivi annuel. Il n'y a pas eu de mesure de PCSK9 plasmatique tout au long du suivi des individus mais seulement à leur inclusion. D'autre part, les dosages ELISA utilisés ne permettent pas la différenciation entre les différentes isoformes de PCSK9 après modifications post-traductionnelles (*i.e.* phosphorylation, clivage protéolytique, *etc.*) qui pourraient être régulées de façon différentes (Gauthier et al., 2018).

En conclusion, il s'agit de la première étude qui démontre l'absence d'association entre les niveaux circulants de PCSK9 et le risque de développer un DT2 par des analyses longitudinales. Les niveaux de PCSK9 ne sont pas prédictifs de la survenue du DT2 chez les individus prédiabétiques. Ces résultats sont rassurants concernant le risque d'apparition du DT2 après l'inhibition de PCSK9 par les anticorps monoclonaux dirigés contre PCSK9 qui ciblent préférentiellement la forme circulante de PCSK9.

4. Troisième article

Les effets de la modulation de PCSK9 sur la fonction des cellules β pancréatiques humaines

Stéphane Ramin-Mangata, Aurélie Thédrez, Valentin Blanchard, Nicolas Diotel, Brice Nativel, Matthieu Wargny, Audrey Aguesse, Stéphanie Billon-Crossouard, Cécile Vindis, Cédric Le May, Philippe Hulin, Mathieu Armaney, Valery Gmyr, François Pattou, Mikaël Croyal, Olivier Meilhac, Estelle Nobécourt Dupuy, Bertrand Cariou, Gilles Lambert

La version révisée devait être resoumise dans Atherosclerosis en mai 2020 (retardée par Covid-19). Elle le sera d'ici fin août 2020.

Chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale avec une mutation sur le LDLR, la prévalence du DT2 est diminuée de moitié comparée aux membres sains de leurs familles (Besseling et al., 2015). A l'inverse, les statines qui augmentent l'expression du LDLR sont associées de façon positive à l'apparition du DT2 (Ridker et al., 2012). Les statines augmentent l'expression du *LDLR*, au niveau génique, ce qui pourrait provoquer l'engorgement en cholestérol des cellules β pancréatiques et altérer le GSIS. En effet, l'incubation d'îlots pancréatiques humains isolés avec un excès de LDL diminue le GSIS (Rütti et al., 2009). Les variants génétiques pertes de fonction de *l'HMGCR* (cible des statines) ou de *PCSK9* sont eux aussi associés de façon positive à la survenue du DT2 (Ference et al., 2016; Lotta et al., 2016;

Schmidt et al., 2017). Des études ont reporté l'expression de l'ARNm de *PCSK9* au niveau du pancréas mais les données sont conflictuelles concernant le type de cellules qui l'exprime. Certaines études ont mis en évidence l'ARNm de *PCSK9* au niveau des cellules δ et d'autres au niveau des cellules β pancréatiques (Langhi et al., 2009; Mbikay et al., 2010; Ndiaye et al., 2017; Da Dalt et al., 2018). Lors de la rédaction de la revue bibliographique, nous avons également publié des données sur l'expression de l'ARNm de *PCSK9* dans les cellules pancréatiques humaines (Ramin-Mangata et al., 2018). Par tri cellulaires de cellules isolées d'îlots de Langerhans, nous avons montré que le niveau d'ARNm de *PCSK9* était augmenté dans la population cellulaire enrichie en cellules β pancréatiques par rapport à celui de la population cellulaire enrichie avec les autres types cellulaires et à celui de la population cellulaire non triée **(Figure 42)**.

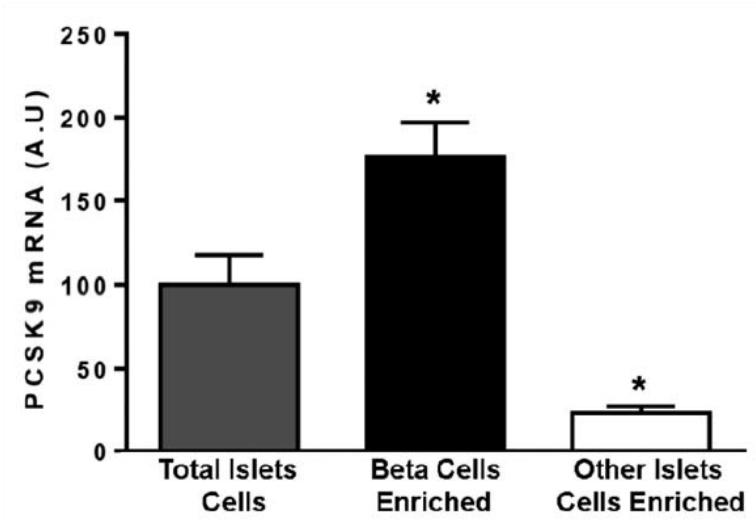


Figure 42 : Expression différentielle de PCSK9 dans les îlots de Langerhans humains isolés (extraite de Ramin-Mangata et al., 2018). Après un tri cellulaire, l'expression de l'ARNm de PCSK9 est plus élevée dans la population cellulaire enrichie en cellules β comparée aux populations de cellules non triées ou enrichies en cellules autres que les cellules β.

Mon troisième objectif de thèse était de déterminer si PCSK9 ou son inhibition affecte le GSIS. J'ai d''abord investigué l'expression de PCSK9 par immunofluorescence sur des coupes de

pancréas humains de 6 donneurs. Dans une lignée de cellules β pancréatiques humaines, les EndoC-βH1, j'ai étudié les effets de la mévastatine, de PCSK9 recombinant, d'Alirocumab et d'un siRNA dirigé contre PCSK9 sur l'expression et la fonction du LDLR ainsi que sur le GSIS en présence ou non de LDL.

Elsevier Editorial System(tm) for
Atherosclerosis or its open access mirror
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Effects of Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9 modulation in human pancreatic beta cells function

Article Type: Research paper

Section/Category: Basic Research

Keywords: LDL receptor; Statins; PCSK9; PCSK9 inhibitors; Beta cell

Corresponding Author: Dr. Stéphane RAMIN-MANGATA, Ph.D

Corresponding Author's Institution: INSERM UMR1188 DéTROI

First Author: Stéphane RAMIN-MANGATA, Ph.D

Order of Authors: Stéphane RAMIN-MANGATA, Ph.D; Aurélie Thedrez; Valentin Blanchard; Nicolas Diotel; Brice Natively; Matthieu Wargny; Audrey Aguesse; Stéphanie Billon-Crossouard; Cécile Vindis; Cédric Le May; Philippe Hulin; Mathieu Armanet; Valery Gmyr; François Pattou; Mikaël Croyal; Olivier Meilhac; Estelle Nobécourt-Dupuy; Bertrand Cariou; Gilles Lambert

Abstract: Background and aims - Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 (PCSK9) is an endogenous inhibitor of the LDL receptor (LDLR). Mendelian randomization studies suggest that PCSK9 deficiency may promote diabetes risk, but the underlying mechanisms remain unknown. The aim of our study was to investigate whether PCSK9 or its inhibition may modulate beta cell function.
Methods - We assessed PCSK9 and insulin colocalization in human pancreatic sections by epifluorescent and confocal microscopy. We also investigated the expression and function of PCSK9 in the human EndoC┬┬H1 beta cell line by ELISA and flow cytometry using recombinant or PCSK9 inhibition with Alirocumab or siRNA. LDLR expression and LDL uptake were assessed by flow cytometry.
Results - PCSK9 was expressed and secreted by isolated beta cells from human pancreas and from EndoC┬┬H1 cells. Its secretion was enhanced by statin treatment. Recombinant PCSK9 decreased LDLR abundance at the surface of these cells, an effect abrogated by Alirocumab. Alirocumab as well as PCSK9 silencing increased LDLR expression at the surface of EndoC┴┴H1 cells. Neither exogenous PCSK9, nor Alirocumab, nor PCSK9 silencing significantly altered glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) from these cells. High-low density lipoproteins (LDL) concentrations decreased GSIS, but the addition of PCSK9 or its inhibition did not modulate this phenomenon.
Conclusions - While PCSK9 regulates LDLR abundance in beta cells, inhibition of exogenous or endogenous PCSK9 does not appear to significantly impact insulin secretion. This is reassuring for the safety of PCSK9 inhibitors in terms of beta cell function.

Highlights

HIGHLIGHTS

Like statins, PCSK9 inhibitors have been proposed to increase the diabetes risk.

Human pancreatic beta cells express and secrete PCSK9.

LDL receptor is regulated by exogenous and endogenous PCSK9 in beta cells.

PCSK9 or its inhibition do not altered insulin secretion from human beta cells.

Inhibiting circulating PCSK9 should be safe for glucose homeostasis.

***Abstract, Title Page, Manuscript, References, Legends**

Effects of Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9 modulation in human pancreatic beta cells function

Authors: Stéphane Ramin-Mangata[1]*, Aurélie Thedrez[2,3]*, Valentin Blanchard[1], Nicolas Diotel[1], Brice Nativel[1], Matthieu Wargny[3,4], Audrey Aguesse[2], Stéphanie Billon-Crossouard[2], Cécile Vindis[5], Cédric Le May[3], Philippe Hulin[6], Mathieu Armanet[7], Valery Gmyr[8], François Pattou[8,9], Mikaël Croyal[2], Olivier Meilhac[1], Estelle Nobécourt Dupuy[1,10], Bertrand Cariou[3], and Gilles Lambert[1]

Affiliations: [1]Université de La Réunion, Inserm UMR 1188 DéTROI, Sainte Clotilde, France; [2]Université de Nantes, CRNH Ouest, Inra UMR 1280 PhAN, Nantes, France; [3]L'institut du Thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France; [4]CHU Nantes, INSERM, CIC 1413, Pôle Hospitalo-Universitaire 11: Santé Publique, Clinique des Données, Nantes, F-44093 France; [5]Inserm UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Université de Toulouse, Toulouse, France; [6]Université de Nantes, CHU de Nantes, Inserm UMS 016, Cnrs UMS 3556, Structure Fédérative de Recherche François Bonamy, Micropicell Facility, Nantes, France; [7]Cell Therapy Unit, Hôpital Saint Louis, AP-HP, Université Paris Diderot, Paris, France; [8]European Genomic Institute for Diabetes, Inserm UMR 1190 Translational Research for Diabetes, University of Lille 2, Lille, France; [9]Lille University Hospital, Lille, France ; [10]CHU de La Réunion, Service d'Endocrinologie Nutrition, Saint-Pierre, France.

Corresponding Authors: Pr. Gilles Lambert, Laboratoire Inserm UMR 1188 DéTROI, Plateforme CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, 97490 Sainte Clotilde, France. Tel: + 262 692 437 708; Fax: +262 262 938 237; E-mail: gilles.lambert@univ-reunion.fr

* These authors contributed equally.

Word count: 3934

Number of figures: 5

Non Standard Abbreviations:

AU, Arbitrary Unit

ECM, extracellular matrix

EI, equivalent islets number

FH, Familial Hypercholesterolemia

GSIS, Glucose Stimulated Insulin Secretion

HMGCR, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase

HNF1α, Hepatocyte Nuclear Factor 1α

LDL, Low-Density Lipoprotein

LDL-C, LDL Cholesterol

LDLR, LDL Receptor

MFI, Mean Fluorescence Intensity

NOD, New onset diabetes

PCSK9, Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9

rPCSK9, recombinant PCSK9 D374Y

RMFI, Ratio of Mean Fluorescence Intensities

RT-PCR, Real Time-quantitative Polymerase-Chain Reaction

SREBP2, Sterol Response Element Binding Protein 2

T2D, Type 2 Diabetes

ABSTRACT (244 words)

Background and aims **-** Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 (PCSK9) is an endogenous inhibitor of the LDL receptor (LDLR). Mendelian randomization studies suggest that PCSK9 deficiency may promote diabetes risk, but the underlying mechanisms remain unknown. The aim of our study was to investigate whether PCSK9 or its inhibition may modulate beta cell function.

Methods **-** We assessed PCSK9 and insulin colocalization in human pancreatic sections by epifluorescent and confocal microscopy. We also investigated the expression and function of PCSK9 in the human EndoC−βH1 beta cell line by ELISA and flow cytometry using recombinant or PCSK9 inhibition with Alirocumab or siRNA. LDLR expression and LDL uptake were assessed by flow cytometry.

Results **-** PCSK9 was expressed and secreted by isolated beta cells from human pancreas and from EndoC−βH1 cells. Its secretion was enhanced by statin treatment. Recombinant PCSK9 decreased LDLR abundance at the surface of these cells, an effect abrogated by Alirocumab. Alirocumab as well as PCSK9 silencing increased LDLR expression at the surface of EndoC−βH1 cells. Neither exogenous PCSK9, nor Alirocumab, nor PCSK9 silencing significantly altered glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) from these cells. High-low density lipoproteins (LDL) concentrations decreased GSIS, but the addition of PCSK9 or its inhibition did not modulate this phenomenon.

Conclusions **-** While PCSK9 regulates LDLR abundance in beta cells, inhibition of exogenous or endogenous PCSK9 does not appear to significantly impact insulin secretion. This is reassuring for the safety of PCSK9 inhibitors in terms of beta cell function.

Keywords – LDL receptor; Statins; PCSK9; PCSK9 inhibitors; Beta cell;

INTRODUCTION

Although obesity and insulin resistance are risk factors, type-2-diabetes (T2D) only develops in individuals who present with defects in the insulin producing beta cells of pancreatic islets (1,2). These defects comprise both a specific impairment of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) and a loss of beta cell mass (3). Changes in lipoproteins levels appear to impact beta cell function and survival, underpinning a role for lipoprotein particles in the pathogenesis of T2D (4). For instance, low-density lipoproteins (LDL) alter GSIS in pancreatic islets *ex vivo*, while high-density lipoproteins seem to exert protective effects (5).

In that respect, the prevalence of T2D is lower in patients with genetically reduced LDLR function (i.e. heterozygous familial hypercholesterolemia (HeFH)) than in unaffected relatives, and T2D prevalence is even lower in patients with the more severe HeFH phenotypes (i.e. those who carry *LDLR* negative mutations) (6). Conversely, statins that lower circulating LDL, primarily by enhancing *LDLR* gene expression, slightly but consistently increase the risk of new onset diabetes (NOD) in predisposed individuals (7).

Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) is a serine protease primarily but not exclusively expressed by the liver and secreted into the blood. PCSK9 binds to the LDLR and after endocytosis targets the LDLR for lysosomal degradation, preventing normal recycling of the receptor to the plasma membrane (8). PCSK9 may also inhibit LDLR abundance at the cell surface via an intracellular route, prior to secretion (9–11). Monoclonal antibodies targeting PCSK9 in the plasma constitute a novel class of LDL lowering agents preferentially used on top of statins to maximally up-regulate LDLR abundance at the cell surface (12,13), and thereby to further reduce the risk of cardiovascular events (14,15).

Activating the LDLR pathway in the liver is anti-atherogenic and clearly beneficial (8), but activating the same pathway in beta cells may be harmful to those cells, potentially by

impacting GSIS and increasing NOD, as it seems to be the case with statins. This hypothesis was recently underpinned by Mendelian randomization studies showing that loss-of-function genetic variants in *HMGCR* (the target of statins) and in *PCSK9* that activate the LDLR pathway and lower LDL-C levels are associated with an increased risk of NOD (16–18).

Given that *PCSK9* gene is expressed in human pancreatic islets (19), and that *PCSK9* mRNA expression is increased (+81±12%) in a sorted cells population enriched in beta cells but reduced (-75±5%) in a sorted cells population enriched in other islets cell types, compared with the entire population of human pancreatic islet cells (20,21), we have investigated at the protein level the expression of PCSK9 in human pancreatic beta cells.

We showed that beta cells express and secrete PCSK9. In addition, we demonstrated that these cells express the LDLR at their plasma membrane and that LDLR abundance is duly regulated by exogenous as well as endogenous PCSK9. Finally, we showed that neither exogenous PCSK9 nor the PCSK9 inhibitor Alirocumab nor PCSK9 silencing with siRNAs significantly impact GSIS.

MATERIALS AND METHODS

Histological analyses - Human pancreas were obtained for research use from six brain-dead multi-organ donors under protocols approved by the Assistance Publique – Hopitaux de Paris (AP-HP) ethics committee, fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Paraffin sections mounted on glass slides (7µm thickness) were deparaffinized and rehydrated in a series of ethanol solutions of decreasing concentrations. Sections were washed with PBS and antigen retrieval performed in a 10mM Tris 1mM EDTA buffer (pH 9) for 10 minutes in a microwave oven (low intensity). Sections were placed in retrieval buffer at room temperature for 15 minutes and subsequently immersed in a 70% isopropanol solution containing 0.25% Sudan black B for 1h45 in the dark at room temperature, to quench pancreatic tissue auto-fluorescence (22). Sections were subsequently rinsed in isopropanol 70% and PBS, and blocked in PBS-5%BSA for 30 minutes. Antibodies were purchased from Abcam (Paris, France) or Invitrogen (Toulouse, France). Sections were incubated with primary antibodies (mouse anti human insulin/proinsulin ab8304 1:1000 dilution, rabbit anti human glucagon ab92517 1:50 dilution, rat anti human somatostatin ab30788 1:50 dilution, goat anti human PCSK9 C-terminal domain ab28770 1:50 dilution, rabbit anti human pro-PCSK9 N-terminal domain ab135647 1:25 dilution) in PBS-1%BSA for 1h30 at room temperature in a wet chamber. Sections were rinsed twice with PBS and incubated with the secondary antibodies (488 Alexa Fluor®-donkey anti-mouse A21292, 488 Alexa Fluor®-donkey anti-rabbit A21206, 488 Alexa Fluor®-goat anti-rat A11006, and 594 DyLight®-donkey anti-goat ab96937, 594 DyLight®-donkey anti-rabbit ab9692, respectively) diluted 1:200 in PBS-1%BSA for 1h30 at room temperature in a dark wet chamber, and counterstained with DAPI (1ng/mL). Sections were rinsed twice with PBS, mounted with coverslides in glycerol, and analyzed on an Eclipse 80i epifluorescence microscope and an A1 RSi confocal microscope

(Nikon, Champigny sur Marne, France). We systematically controlled the absence of cross-reactivity between all antibodies (**Supplemental Figure 1**). Colocalizations were determined using the Volocity 6.3 imaging software (Perkin Elmer, Milburn Hill Road NJ, USA).

Human Pancreatic beta cell line - All reagents were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) unless stated otherwise. EndoC-βH1 cells (23) were purchased from Univercell Biosolutions (Toulouse, France). Cells were grown at 37°C on Extracellular Matrix (ECM) (100 µg/mL) and fibronectin (2µg/ml) coated flasks in DMEM containing 5.6mM glucose (Life Technologies, Saint Aubin, France), 2% BSA fraction V, 10mM nicotinamide (Merck Millipore, Fontenay Sous Bois, France), 50µM 2-mercaptoethanol, 5.5µg/mL transferrin, 6.7ng/mL sodium selenite, 100U/mL penicillin and 100µg/mL streptomycin (23). EndoC-βH3 cells (Univercell Biosolutions) were grown in the same medium supplemented with 10µg/ml puromycine (InvivoGen) (24).

LDLR expression - EndoC-βH1 cells were plated on ECM-fibonectin coated flat bottom 96-well plates (70,000 cells/well) in Optiβ1® medium (Univercell Biosolutions) containing 5.6mM glucose for 5 days at 37°C. Culture medium was replaced with Optiβ2® medium (Univercell Biosolutions) containing 2.8mM glucose with or without 10µg/mL mevastatin for 16h. Culture medium was replaced with fresh Optiβ2® medium with or without 10µg/mL mevastatin, and supplemented or not with 600ng/mL of recombinant PCSK9-D374Y (rPCSK9) (Circulex, Nagano, Japan) for 4h. In a subset of experiments, Alirocumab (Sanofi, Chilly-Mazarin, France), a fully human monoclonal antibody targeting PCSK9, was added concomitantly into the wells at a final concentration of 10µg/mL (12,13). Cells were washed gently with PBS, lifted with Accutase®, re-suspended in ice cold PBS, and washed twice in ice-cold PBS containing 1% BSA. Cells were incubated with an allophycocyanin-conjugated

antibody against human LDLR (clone 472413) or an IgG1 (clone 11711) isotype control (R&D Systems, Lille, France) at 0.625µg/mL in PBS-1%BSA for 20 min at room temperature in the dark. Cells were then washed twice in ice-cold PBS-1% BSA and once in ice cold PBS before flow cytometry analysis on LSRII (Beckton Dickinson, Le Pont de Claix, France) or CYTOFLEX (Beckman Coulter, Villepinte, France) cytometers using the FlowJo software (Tree Star, Ashland OR, USA). Ratio between the mean fluorescence intensity (MFI) of cells incubated with the anti-LDLR antibody and the MFI of cells incubated with the isotype control was calculated to determine specific level of cell surface LDLR expression (RMFI), expressed in arbitrary units (AU) throughout.

LDL uptake - EndoC-βH1 cells were plated and treated as described above. LDL-BodipyFL (Life Technologies, Saint Aubin, France) was added to the medium at a final concentration of 10µg/mL for the last 3h of the incubation period (i.e. with or without rPCSK9). Cells were washed twice in ice-cold PBS-1% BSA, once in ice-cold PBS and re-suspended in ice-cold PBS supplemented with 0.2% trypan blue to quench cell surface-bound fluorescent LDL prior to flow cytometry analysis (12). Ratio between the MFI of cells incubated with LDL-bodipyFL and the MFI of cells incubated without LDL-Bodipy FL (background fluorescence) was calculated to determine specific level of internalized LDL (RMFI), expressed in arbitrary units (AU) throughout. For confocal microscopy analyses, cells were seeded on ECM-fibonectin coated 8-wells Millicell EZ slide (Merck-Millipore, Fontenay Sous Bois, France) and treated as described above. Cells were washed twice in ice-cold PBS-1% BSA and once in PBS before fixation in PBS containing 4 % paraformaldehyde for 15min at room temperature. After an additional wash in PBS, slides were mounted with coverslides in Prolong anti-fade reagent containing DAPI (Life Technologies) and visualized on a confocal A1 RSi microscope (Nikon, Melville, USA) (12).

Isolated human islets and PCSK9 secretion assay - Human pancreas were harvested from two brain-dead adult human donors (one man, 39 years, 24.3 BMI and one woman, 52 years, 19.8 BMI) in the context of the traceability requirements for the clinical islet transplantation program from the University hospital center of Lille, France (clinicaltrials.gov, NCT01123187, NCT00446264, NCT01148680). Isolation and islet culture were performed as described (25) and experiments were carried out on human islets isolated from both donors with 96.5% and 94.5 % viability and 80% and 90% purity (endocrine versus exocrine tissue), respectively. Purified human islets were cultured in CMRL-1066 medium (Life Technologies) with 5mM glucose, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin and 0.625% Human Serum Albumin (Vialbex, LFB, Courtaboeuf, France) in a humidified atmosphere with 5% CO2 at 37°C. After 24 hours, islets were washed in RPMI medium (Life Technologies) and distributed in 24 wells plate at a density of 200 Equivalent Islets number (EI) per well. Islets were then incubated in RPMI medium containing 2.8mM glucose, 0.5% Fetal Bovine Serum with or without mevastatin (5µg/mL). After 20 hours incubation, culture media were collected and centrifuged to get rid of cell debris and PCSK9 concentrations were measured by ELISA using the PCSK9 Quantikine ELISA kit (R&D Systems). EndoC-βH cells were plated and treated as described above without recombinant PCSK9 in the absence or presence of mevastatin, simvastatin, or pravastatin (10µg/mL). The supernatants were collected and centrifuged to get rid of cell debris and PCSK9 concentrations were measured by ELISA.

Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) - EndoC-βH1 cells were plated on ECM-fibonectin coated flat bottom 12-well plates (375,000 cells/well) in Optiβ1® medium for 5 days at 37°C. Culture medium was replaced with Optiβ2® medium with 0 or 10µg/mL mevastatin, and 0 or 600ng/mL rPCSK9 for 24h at 37°C. In a subset of experiments,

Alirocumab or human LDL isolated from human plasma by sequential ultracentrifugation (1.006 < d < 1.063 g/mL) at 40,000g and dialyzed extensively against PBS before use, were added concomitantly into the wells at final concentrations of 10µg/mL and 250mg/dL, respectively. GSIS was performed as follows: i) cells were washed with βKREBS® buffer (Univercell Biosolutions) supplemented with 0.1% BSA and subsequently incubated in βKREBS® buffer-0.1% BSA for 40min at 37°C. ii) Supernatants were collected on ice and replaced with βKREBS® buffer-0.1% BSA supplemented with 20mM D-glucose for an additional 40min at 37°C. iii) supernatants were collected on ice and cells were lysed on ice in lysis buffer containing Tris 0.02M, Triton X100 1%, Glycerol 10%, 0.137M NaCl, 2mM EGTA and anti-protease (Roche diagnostics) for 10 min. Insulin contents in supernatants collected sequentially and in cell lysates, were determined by ELISA (Mercodia, Uppsala, Sweden). GSIS was assessed as the ratio of insulin content in the second supernatant (post-glucose stimulation) to insulin content in the first supernatant (pre-glucose stimulation). The initial insulin content per well was the sum of the insulin contents measured in cell extracts and both supernatants. In a subset of experiment, GSIS was performed with EndoC-BH1 silenced for PCSK9 (see § below). Optimal concentrations of glucose to assess GSIS in EndoC-βH1 cells was determined by measuring insulin secretion following 40 min treatment with increasing concentrations of glucose (i.e. 0, 2.8, 5, 15, 20 and 25 mM), as described above (**Supplemental Figure 2**). Of note, we did not observe any change in cell viability, as assessed using the lactate deshydrogenase cytotoxicity detection kit ab102526 (Abcam), at any of the glucose concentrations tested or in the absence of glucose for 40 min (*data not shown*).

Silencing of PCSK9 **-** EndoC-βH1 cells were plated on ECM-fibronectin coated flat bottom 12-well plates (375,000 cells/well) in Optiβ1® medium and incubated for 2 days at 37°C.

Cells were then transfected in fresh Optiβ1® medium with 10 pmol/well of either siRNA targeting *PCSK9* (SR316837) from Origene (Rockville MD, USA) or a negative control low GC duplex siRNA (452002, Invitrogen) using Lipofectamine RNAiMax and incubated for 3 days at 37°C. Three days post-transfection, culture medium was replaced with fresh Optiβ2® medium and both cell surface LDLR expression, PCSK9 secretion and GSIS were measured as described above.

Statistical analyses – All results in the text and figures are presented as mean ± SEM. All statistical comparisons were performed using a Mann-Whitney test with GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, CA, USA). $p<0.05$ indicates statistical significance.

RESULTS

Human beta cells express, synthesize and secrete PCSK9 - To demonstrate that beta cells are the islet cell type expressing PCSK9, we assessed PCSK9 protein expression by immunohistochemistry in pancreatic sections from six donors by epi-fluorescent and confocal microscopy. Pancreatic sections were immuno-stained for human PCSK9 as well as for insulin, glucagon, or somatostatin. We first observed that PCSK9 expression was restricted to pancreatic islets (**Figure 1 A-O**). We also observed that PCSK9 localized in insulin-positive cells, but not in glucagon-positive or somatostatin-positive cells, indicating that PCSK9 protein expression is restricted to beta cells in human pancreatic islets. Using a specific antibody targeting the autocatalytic cleavage site of PCSK9, we verified that pro-PCSK9, the zymogen of PCSK9, was also expressed in insulin-positive cells (**Figure 1 P-T**). The co-localization between PCSK9 and insulin as well as the total absence of co-localization between PCSK9 and glucagon or somatostatin were fully ascertained by confocal microscopy (**Figure 2 A-L**). Refined imaging analyses showed subcellular colocalization of insulin and PCSK9, indicating that both proteins colocalize in the same organelles (**Figure 2 M-Q**), although not exclusively. Similar observations were made independently in all pancreas sections from each of our six donors.

We next verified whether human beta cells could secrete PCSK9. We therefore assessed PCSK9 protein secretion in the supernatant of a unique human clonal beta cell line, the EndoC-βH1 cells. These cells secreted substantial amounts of PCSK9 (**Figure 3**). Since PCSK9 is known to be up-regulated by statins in the hepatocyte (26), we also measured PCSK9 secretion from EndoC-βH1 cells following 20 hours treatment with statins. PCSK9 secretion was significantly increased following incubation with mevastatin, simvastatin and pravastatin (**Figure 3A**). Since silencing of the *SV40* immortalization transgene in EndoC-

βH1 cells leads to a phenotype close to that of β-cells in an adult pancreas (i.e. elevated intracellular insulin content and reduced proliferative capacity) (27), we ascertained whether PCSK9 secretion from these cells was maintained at comparable levels under these conditions. We silenced the *SV40* immortalization transgene of EndoC-βH1 cells (**Supplemental Figure 3A**) and verified that PCSK9 secretion from these cells remained steady (**Supplemental Figure 3C**). Of note, following *SV40* silencing, the intracellular insulin content of EndoC-βH1 increased by 90% indicative of an enhancement of the β-cell specific features mentioned above (**Supplemental Figure 3C**) (28). Mevastatin treatment increased PCSK9 secretion by 92% in silenced EndoC-βH1 cells (*data not shown*). Results obtained in EndoC-βH1 cells were confirmed in another line of human clonal beta cells, the EndoC-βH3, derived from a distinct donor (24). EndoC-βH3 secreted similar amounts of PCSK9 than EndoC-βH1 under basal conditions, and PCSK9 secretion also increased upon statin treatment in this cell line (*data not shown*). In addition, we showed that PCSK9 was secreted from pancreatic islets isolated from two human donors, an effect significantly increased upon treatment of the islets with mevastatin (**Figure 3B**). Taken together, these results demonstrate that human beta cells synthesize and secrete PCSK9 and that PCSK9 expression is increased by statin treatment in beta cells.

LDLR expression is regulated both by exogenous and endogenous PCSK9 in human beta cells - To determine whether PCSK9 alone or on top of statins modulates LDLR expression in human beta cells, we next assessed cell-surface LDLR expression in EndoC-βH1 cells treated with or without mevastatin, recombinant PCSK9 gain-of-function D374Y (rPCSK9), and/or Alirocumab (**Figure 4A**) by flow cytometry. Under basal culture conditions, the abundance of the LDLR at the plasma membrane of EndoC-βH1 was found at RMFI levels of 50.4±10.8 AU. Mevastatin treatment significantly increased LDLR cell surface expression (+83%). In

contrast, exogenous rPCSK9 alone or on top of mevastatin, significantly reduced the abundance of the LDLR at the surface of these cells by 78% and 63%, respectively (**Figure 4A**). We also tested the PCSK9 inhibitor Alirocumab under these experimental conditions. Alirocumab alone did not significantly alter the levels of LDLR expressed at the surface of EndoC-βH1 cells. However, on top of mevastatin (i.e. when endogenous PCSK9 secretion from these cells is maximal), Alirocumab significantly increased LDLR cell surface expression by 17%. Alirocumab restored the levels of LDLR expression at the surface of EndoC-βH1 cells treated with rPCSK9 in the absence as well as in the presence of mevastatin (**Figure 4A**). In addition, we also assessed the cellular uptake of fluorescent LDL in EndoC-βH1cells by flow cytometry (**Figure 4B**). LDL uptake was found at RMFI levels of 187±22 AU under basal culture conditions. In line with the variations in LDLR cell surface expression observed above, rPCSK9 treatment alone or with mevastatin significantly reduced fluorescent LDL uptake by 82% and 52% respectively, whereas mevastatin increased fluorescent LDL uptake by 36% in these cells (**Figure 4B**). Variations in fluorescent LDL uptake upon these experimental conditions were visualized by confocal microscopy and paralleled the patterns of expression of the LDLR at the surface of EndoC-βH1cells (**Figure 4C**).

To specifically test the effect of endogenous PCSK9 on LDLR expression, we next silenced *PCSK9* in EndoC-βH1 using siRNAs and assessed PCSK9 secretion as well as cell surface LDLR expression as above (**Figure 4D-E**). As anticipated PCSK9 silencing reduced the secretion of PCSK9 in the culture medium (-47%), which paralleled a significant increase in cell surface LDLR abundance (+27%). These combined results indicate that LDLR expression is modulated by statins and by both endogenous and exogenous PCSK9 in human beta cells and that these effects are reversed upon PCSK9 inhibition.

PCSK9 does not significantly alter GSIS - To establish whether PCSK9 alters insulin secretion from human beta cells, we undertook a series of insulin secretions measurements (GSIS) using the EndoC-βH1cell line grown in a culture medium containing or not mevastatin, rPCSK9, and/or Alirocumab **(Figure 5)**. We found that neither rPCSK9 nor mevastatin significantly modulated GSIS **(Figure 5A)** and neither did we observe any significant change in intra-cellular insulin contents **(Figure 5B)**. Likewise, the PCSK9 inhibitor Alirocumab did not significantly alter GSIS from EndoC-βH1 cells in each of the experimental conditions tested (**Figure 5C**). We next assessed the impact of *PCSK9* silencing on GSIS from EndoC-βH1 cells. Whereas *PCSK9* silencing increased LDLR cell surface expression, it did not significantly alter GSIS from these cells (**Figure 5D**). We also investigated the effects of rPCSK9 with or without mevastatin on EndoC-βH1 cells exposed to high concentrations of purified human LDL, that have been reported to reduce GSIS (5) (**Figure 5E-F).** The exposure of beta cells to LDL led to a 49% decrease in GSIS without altering intra-cellular insulin contents. PCSK9 alone or on top of mevastatin did not significantly modulate GSIS from EndoC-βH1 cells exposed to LDL. Taken together these results indicate that PSCK9 and Alirocumab do not alter GSIS from human beta cells.

DISCUSSION

In an attempt to elucidate the role of PCSK9 in the endocrine pancreas, we have shown that PCSK9 is expressed, synthesized and secreted from human beta cells. We have also established that exogenous PCSK9 modulates the expression of the LDLR at the plasma membrane of the EndoC-βH1 human pancreatic beta cell line. This effect was abolished in the presence of the PCSK9 inhibitor Alirocumab. Reassuringly, neither statins nor PCSK9 nor Alirocumab significantly altered the ability of human beta cells to secrete insulin in response to glucose.

It is well established that the LDLR is expressed in the endocrine pancreas, in particular in beta cells (29–31). In the present study, we demonstrate that PCSK9 is expressed in insulin producing human beta cells, in line with previous studies showing substantial PCSK9 expression in rodent beta cell lines (32,33) and in human pancreatic islets (19). We also showed that neither alpha cells nor delta cells significantly express PCSK9, discrepant with previous reports showing PCSK9 expression in delta cells by immunohistochemistry (19,34). We do not have a clear explanation for this discrepancy beyond technicalities (different antibodies were used), but recent mRNA data clearly indicates a specific endogenous expression of *PCSK9* in human beta cells (20,21), furthered by our observation of pro-PCSK9 in this cell type. The up-regulation of PCSK9 secretion by statins in two human EndoC-βH cell lines, similar to what occurs in hepatocytes (26), underlines the physiological pattern of PCSK9 expression in this particular cell type. Yet the relevance of the colocalization between PCSK9 and insulin/proinsulin in beta cells subcellular compartments remains to be established. To date, only two convertases (PCSK1 and PCSK2) are known to directly interact with insulin, as they promote proinsulin cleavage into insulin and C-peptide (35). Noteworthy, *PCSK9* gene expression is induced by the transcription factor HNF1α

(hepatocyte nuclear factor 1α), a major activator of the insulin gene (36). An interesting avenue would be to determine whether *PCSK9* gene expression in β-cells is primarily modulated by HNF1α or via the canonical SREBP2 (sterol response element binding protein 2) pathway.

It is also well established that LDLR abundance at the surface of many cell types is positively modulated by statins and negatively modulated by circulating PCSK9 primarily via the endo-lysosomal degradation route (8). Here we showed in human EndoC-βH1 that LDLR cell surface expression is increased by statin treatment and reduced by exogenous rPCSK9, as it is the case in almost every single cell type or tissue except the adrenals (37–39). The effect of exogenous rPCSK9 on LDLR expression was abolished by the PCSK9 inhibitor Alirocumab. Our results extend the observations made in previous studies showing that PCSK9 deficiency is associated with higher LDLR expression in whole mouse pancreas and isolated islets, and that the addition of exogenous PCSK9 reduces LDLR expression in human isolated islets (19,33). We also showed that the addition of exogenous rPCSK9, mevastatin, or Alirocumab did not significantly alter GSIS, even in lipotoxic culture conditions (i.e. in presence of high LDL concentrations). EndoC-βH1 cells are perfectly suited to study GSIS, as no other human beta pancreatic cell line secretes insulin in a dose dependent manner in response to glucose (40). In agreement with these results, GSIS from wild type or PCSK9 knockout mice pancreatic islets were found similar in a previous study (19). The absence of effect of PCSK9 inhibition with Alirocumab on GSIS in our cellular model is in line with the fact that neither Evolocumab (14) nor Alirocumab (15) have shown any sign of increased incident diabetes in clinical trials so far. In agreement with these observations, we recently reported that plasma PCSK9 concentrations do not predict the risk of T2D in subjects with prediabetes (41).

Based on the results of the present study, we can cautiously conclude that PCSK9 is physiologically expressed in human beta cells and that circulating PCSK9 (and hence PCSK9

inhibition with mAbs) has the ability to regulate LDLR abundance at the surface of these cells without directly impacting their ability to secrete insulin in response to glucose. Taken together, the present results are reassuring regarding the safety of PCSK9 inhibitors in terms of beta-cell function (42,43). However, regarding the potential link between PCSK9 and glucose homeostasis raised by Mendelian randomization studies, it is conceivable that the effect of PCSK9-deficiency on glucose homeostasis may not be restricted to pancreatic islets or insulin secretion. For instance, plasma PCSK9 concentrations have been found to be positively associated with markers of insulin resistance such as HOMA-IR or hepatic glucose production assessed during hyperinsulinemic-euglycemic clamps (44,45). Additional studies are therefore warranted to decipher the precise role of PCSK9 in diabetes risk.

CONFLICTS OF INTEREST: GL has received research funding, consulting fees and/or honoraria from Amgen, Sanofi-Regeneron, Pfizer, Affiris and Nyrada Inc. BC has received research funding, consulting fees and/or honoraria from Abbott, Akcea, Amgen, AstraZeneca, Genfit, Pierre Fabre, Eli Lilly and Co, MSD Merck and Co, Novo Nordisk, Pfizer, Regeneron, and Sanofi.

FINANCIAL SUPPORT: This work was supported by an IIS grant from Sanofi-Regeneron and by the French National Project CHOPIN (CHolesterol Personalized Innovation) funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-RHUS-0007). Gilles Lambert is the recipient of an Allocation de Recherche Chaire Mixte (Inserm-Université de La Réunion). VB is a recipient of a scholarship from the Région Réunion and the European Union (European Regional Development Fund INTERREG V).

CONTRIBUTION STATEMENT: S.R.M, A.T, V.B, N.D, B.N, M.W, A.A, S.B.C, C.V, P.H, M.A, V.G, F.P, M.C performed experiments. S.R.M, A.T, B.C and G.L wrote the manuscript. C.L.M, M.C, O.M, and E.N contributed to discussion and helped to write manuscript. B.C and G.L oversaw the project. G.L is the guarantor of this work.

ACKNOWLEDGEMENTS: We deeply thank Dr. Raphaël Scharfmann (Cochin Institute, Paris) who initially shared the information that PCSK9 mRNA is expressed in sorted human beta-cells and in human beta-cell lines. We also thank the Cytometry Facility Cytocell from Nantes for expert technical assistance.

REFERENCES

1. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature. 2006 Dec 14;444(7121):840–6.

2. Biden TJ, Boslem E, Chu KY, Sue N. Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, β cell failure, and type 2 diabetes mellitus. Trends Endocrinol Metab TEM. 2014 Aug;25(8):389–98.

3. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. J Clin Invest. 2006 Jul;116(7):1802–12.

4. Kruit JK, Brunham LR, Verchere CB, Hayden MR. HDL and LDL cholesterol significantly influence beta-cell function in type 2 diabetes mellitus. Curr Opin Lipidol. 2010 Jun;21(3):178–85.

5. Rütti S, Ehses JA, Sibler RA, Prazak R, Rohrer L, Georgopoulos S, et al. Low- and high-density lipoproteins modulate function, apoptosis, and proliferation of primary human and murine pancreatic beta-cells. Endocrinology. 2009 Oct;150(10):4521–30.

6. Besseling J, Kastelein JJP, Defesche JC, Hutten BA, Hovingh GK. Association between familial hypercholesterolemia and prevalence of type 2 diabetes mellitus. JAMA. 2015 Mar 10;313(10):1029–36.

7. Swerdlow DI, Preiss D, Kuchenbaecker KB, Holmes MV, Engmann JEL, Shah T, et al. HMG-coenzyme A reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: evidence from genetic analysis and randomised trials. Lancet Lond Engl. 2015 Jan 24;385(9965):351–61.

8. Lambert G, Sjouke B, Choque B, Kastelein JJP, Hovingh GK. The PCSK9 decade. J Lipid Res. 2012 Dec;53(12):2515–24.

9. Poirier S, Mayer G, Poupon V, McPherson PS, Desjardins R, Ly K, 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.

10. Cariou B, Si-Tayeb K, Le May C. Role of PCSK9 beyond liver involvement. Curr Opin Lipidol. 2015 Jun;26(3):155–61.

11. Poirier S, Mamarbachi M, Chen W-T, Lee AS, Mayer G. GRP94 Regulates Circulating Cholesterol Levels through Blockade of PCSK9-Induced LDLR Degradation. Cell Rep. 2015 Dec 15;13(10):2064–71.

12. Thedrez A, Sjouke B, Passard M, Prampart-Fauvet S, Guédon A, Croyal M, et al. Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Inhibition for Autosomal Recessive Hypercholesterolemia-Brief Report. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016;36(8):1647–50.

13. Thedrez A, Blom DJ, Ramin-Mangata S, Blanchard V, Croyal M, Chemello K, et al. Homozygous Familial Hypercholesterolemia Patients With Identical Mutations Variably Express the LDLR (Low-Density Lipoprotein Receptor): Implications for the Efficacy of Evolocumab. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018 Mar;38(3):592–8.

14. Sabatine MS, Leiter LA, Wiviott SD, Giugliano RP, Deedwania P, De Ferrari GM, et al. Cardiovascular safety and efficacy of the PCSK9 inhibitor evolocumab in patients with and without diabetes and the effect of evolocumab on glycaemia and risk of new-onset diabetes: a prespecified analysis of the FOURIER randomised controlled trial. Lancet Diabetes Endocrinol. 2017 Dec;5(12):941–50.

15. Colhoun HM, Ginsberg HN, Robinson JG, Leiter LA, Müller-Wieland D, Henry RR, et al. No effect of PCSK9 inhibitor alirocumab on the incidence of diabetes in a pooled analysis from 10 ODYSSEY Phase 3 studies. Eur Heart J. 2016 Oct 14;37(39):2981–9.

16. Ference BA, Robinson JG, Brook RD, Catapano AL, Chapman MJ, Neff DR, et al. Variation in PCSK9 and HMGCR and Risk of Cardiovascular Disease and Diabetes. N Engl J Med. 2016 01;375(22):2144–53.

17. Schmidt AF, Swerdlow DI, Holmes MV, Patel RS, Fairhurst-Hunter Z, Lyall DM, et al. PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a mendelian randomisation study. Lancet Diabetes Endocrinol. 2017 Feb;5(2):97–105.

18. Lotta LA, Sharp SJ, Burgess S, Perry JRB, Stewart ID, Willems SM, et al. Association Between Low-Density Lipoprotein Cholesterol-Lowering Genetic Variants and Risk of Type 2 Diabetes: A Meta-analysis. JAMA. 2016 Oct 4;316(13):1383–91.

19. Langhi C, Le May C, Gmyr V, Vandewalle B, Kerr-Conte J, Krempf M, et al. PCSK9 is expressed in pancreatic delta-cells and does not alter insulin secretion. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Dec 25;390(4):1288–93.

20. Ndiaye FK, Ortalli A, Canouil M, Huyvaert M, Salazar-Cardozo C, Lecoeur C, et al. Expression and functional assessment of candidate type 2 diabetes susceptibility genes identify four new genes contributing to human insulin secretion. Mol Metab. 2017 Jun;6(6):459–70.

21. Ramin-Mangata S, Blanchard V, Lambert G. Key aspects of PCSK9 inhibition beyond LDL lowering. Curr Opin Lipidol. 2018 Dec;29(6):453–8.

22. Erben T, Ossig R, Naim HY, Schnekenburger J. What to do with high autofluorescence background in pancreatic tissues - an efficient Sudan black B quenching method for specific immunofluorescence labelling. Histopathology. 2016 Sep;69(3):406–22.

23. Ravassard P, Hazhouz Y, Pechberty S, Bricout-Neveu E, Armanet M, Czernichow P, et al. A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. J Clin Invest. 2011 Sep;121(9):3589–97.

24. Benazra M, Lecomte M-J, Colace C, Müller A, Machado C, Pechberty S, et al. A human beta cell line with drug inducible excision of immortalizing transgenes. Mol Metab. 2015 Dec;4(12):916–25.

25. Kerr-Conte J, Vandewalle B, Moerman E, Lukowiak B, Gmyr V, Arnalsteen L, et al. Upgrading pretransplant human islet culture technology requires human serum combined with media renewal. Transplantation. 2010 May 15;89(9):1154–60.

26. 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 Aug;24(8):1454–9.

27. Ihler F, Vetter EV, Pan J, Kammerer R, Debey-Pascher S, Schultze JL, et al. Expression of a neuroendocrine gene signature in gastric tumor cells from CEA 424-SV40 large T antigen-transgenic mice depends on SV40 large T antigen. PloS One. 2012;7(1):e29846.

28. Scharfmann R, Pechberty S, Hazhouz Y, von Bülow M, Bricout-Neveu E, Grenier-Godard M, et al. Development of a conditionally immortalized human pancreatic β cell line. J Clin Invest. 2014 May;124(5):2087–98.

29. Grupping AY, Cnop M, Van Schravendijk CF, Hannaert JC, Van Berkel TJ, Pipeleers DG. Low density lipoprotein binding and uptake by human and rat islet beta cells. Endocrinology. 1997 Oct;138(10):4064–8.

30. Roehrich M-E, Mooser V, Lenain V, Herz J, Nimpf J, Azhar S, et al. Insulin-secreting beta-cell dysfunction induced by human lipoproteins. J Biol Chem. 2003 May 16;278(20):18368–75.

31. Cnop M, Hannaert JC, Grupping AY, Pipeleers DG. Low density lipoprotein can cause death of islet beta-cells by its cellular uptake and oxidative modification. Endocrinology. 2002 Sep;143(9):3449–53.

32. 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 U S A. 2003 Feb 4;100(3):928–33.

33. Mbikay M, Sirois F, Mayne J, Wang G-S, Chen A, Dewpura T, et al. PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities. FEBS Lett. 2010 Feb 19;584(4):701–6.

34. Da Dalt L, Ruscica M, Bonacina F, Balzarotti G, Dhyani A, Di Cairano E, et al. PCSK9 deficiency reduces insulin secretion and promotes glucose intolerance: the role of the low-density lipoprotein receptor. Eur Heart J. 2018 Jul 2;

35. Seidah NG, Prat A. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. Nat Rev Drug Discov. 2012 May;11(5):367–83.

36. Dong B, Wu M, Li H, Kraemer FB, Adeli K, Seidah NG, et al. Strong induction of PCSK9 gene expression through HNF1alpha and SREBP2: mechanism for the resistance to LDL-cholesterol lowering effect of statins in dyslipidemic hamsters. J Lipid Res. 2010 Jun;51(6):1486–95.

37. 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.

38. Luo Y, Warren L, Xia D, Jensen H, Sand T, Petras S, et al. Function and distribution of circulating human PCSK9 expressed extrahepatically in transgenic mice. J Lipid Res. 2009 Aug;50(8):1581–8.

39. Tavori H, Giunzioni I, Linton MF, Fazio S. Loss of plasma proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) after lipoprotein apheresis. Circ Res. 2013 Dec 6;113(12):1290–5.

40. Weir GC, Bonner-Weir S. Finally! A human pancreatic β cell line. J Clin Invest. 2011 Sep;121(9):3395–7.

41. Ramin-Mangata S, Wargny M, Pichelin M, May CL, Thédrez A, Blanchard V, et al. Circulating PCSK9 levels are not associated with the conversion to type 2 diabetes. Atherosclerosis. 2020 Jan 1;293:49–56.

42. Verbeek R, Hovingh GK. Diabetes: Anti-PCSK9 antibodies - beneficial or inducers of diabetes? Nat Rev Endocrinol. 2017 Nov 9;13(12):694–5.

43. Sattar N. PCSK9 inhibitors and diabetes risk: a question worth asking? Eur Heart J. 2016 Oct 14;37(39):2990–2.

44. Baass A, Dubuc G, Tremblay M, Delvin EE, O'Loughlin J, Levy E, 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.

45. Cariou B, Langhi C, Le Bras M, Bortolotti M, Lê K-A, Theytaz F, et al. Plasma PCSK9 concentrations during an oral fat load and after short term high-fat, high-fat high-protein and high-fructose diets. Nutr Metab. 2013 Jan 8;10(1):4.

FIGURE LEGENDS

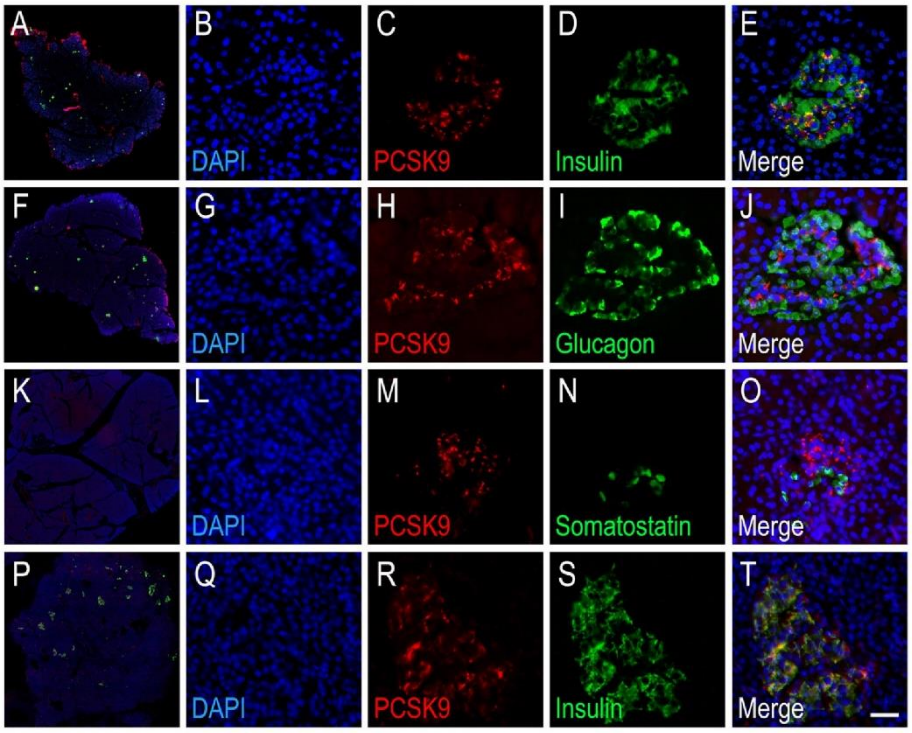
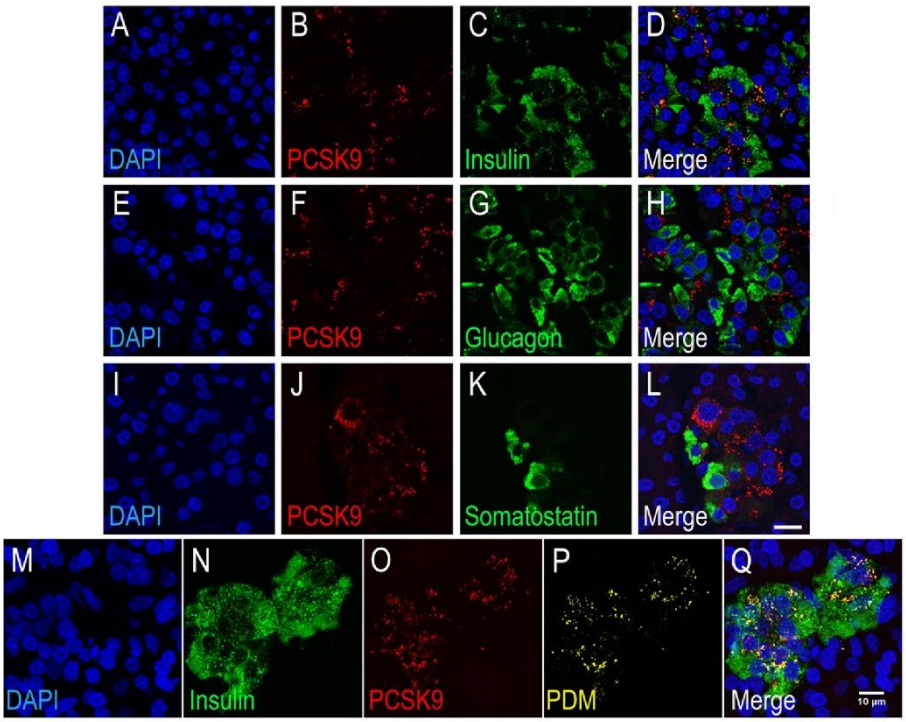
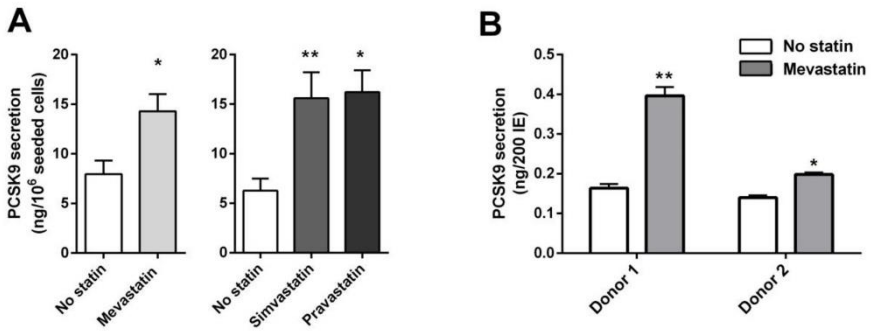


FIGURE 1 – Total PCSK9 and pro-PCSK9 expression in human pancreas is restricted to Langerhans Islets cells - Epifluorescent microscopic analyses of human pancreatic sections immuno-stained for human PCSK9 C-terminal domain **(A-O)** or N-terminal domain **(P-T)**, insulin **(A-E and P-T)**, glucagon **(F-J)**, or somatostatin **(K-O)**. Entire pancreatic sections are shown in panels **(A)**, **(F)**, **(K)** and **(P)**. The 25µm scale is for all panels except **(A)**, **(F)**, **(K)** and **(P)**.



<u>FIGURE 2</u> - PCSK9 expression in human pancreatic islets is restricted to beta cells and colocalizes with insulin - Confocal microscopic analyses of human pancreatic sections immuno-stained for human PCSK9, insulin **(A-D)**, glucagon **(E-H)**, or somatostatin **(I-L)**. Accurate colocalization patterns between insulin and PCSK9 within islets beta cells are shown in panels **(M-Q)** and calculated as the product of the difference from the mean (PDM) with Volocity **(P)**. Scales: 15µm **(panels A-L)** and 10µm **(panels M-Q)**.



<u>FIGURE 3.</u> PCSK9 is secreted from human clonal beta cells and from isolated human pancreatic islets - (Panel A) EndoC-βH1 cells were treated for 20 hours with or without mevastatin, pravastatin or simvastatin (10µg/mL) and PCSK9 secretion was measured in the culture medium in the last 4 hours of the incubation period. Results are expressed as mean±SEM per 10^6 seeded cells (*n=10* for mevastatin and *n=5* for pravastatin and simvastatin). **(Panel B)** Human pancreatic islets isolated from two donors were treated with or without 5µg/mL mevastatin for 20 hours. Mean±SEM of PCSK9 secretion per 200 seeded Equivalent Islets (EI) within the 20 hours incubation period are shown. * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ vs. no statin.

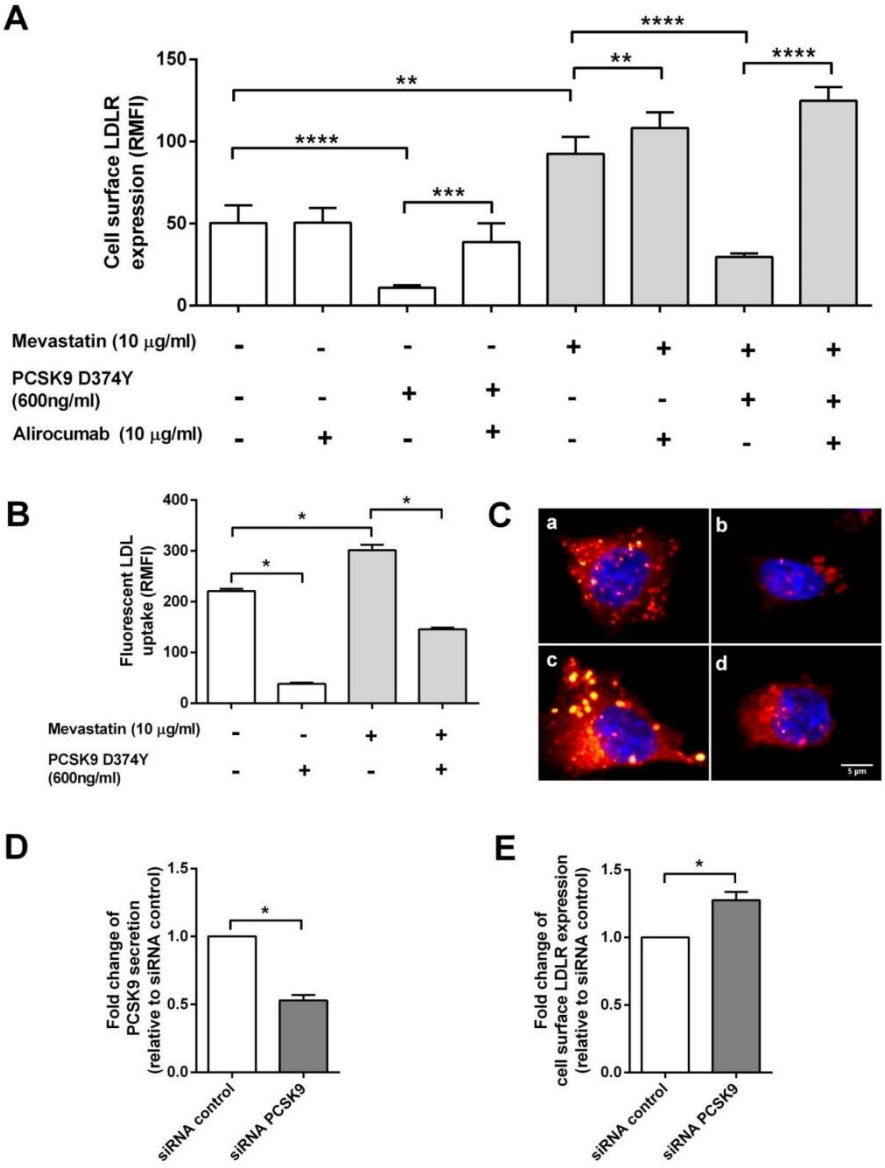
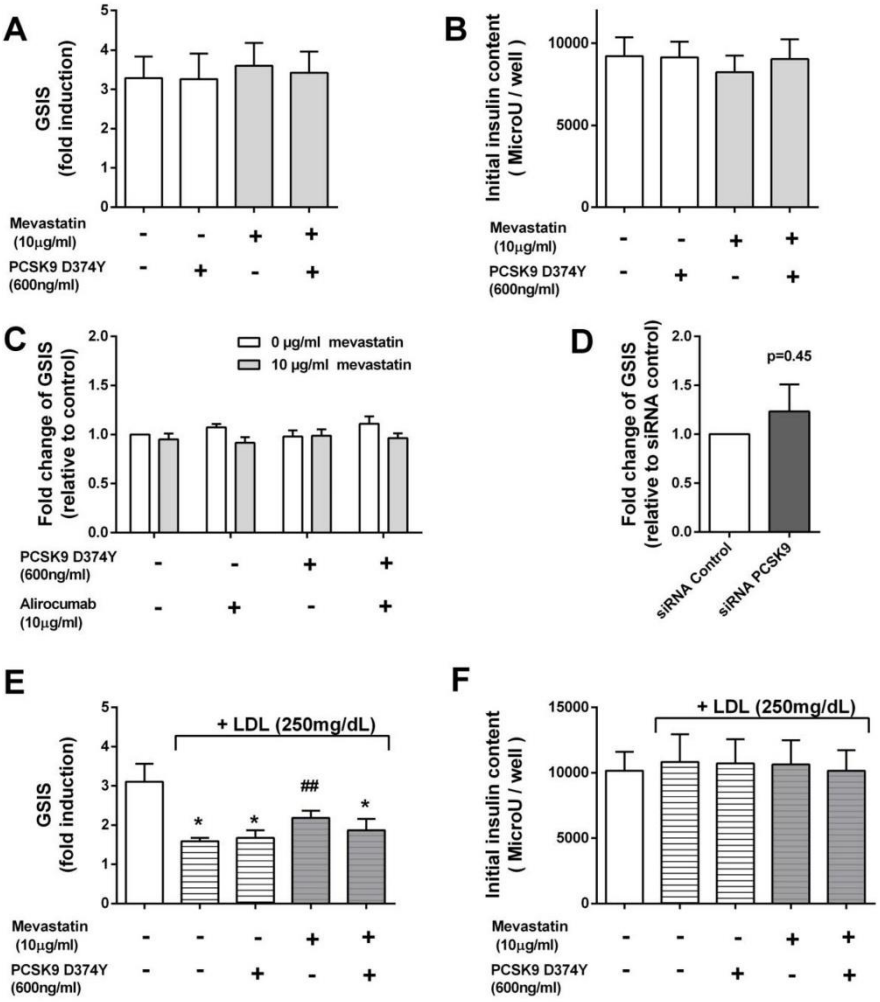


FIGURE 4 - Mevastatin increases whereas PCSK9 reduces LDLR cell surface expression in human clonal beta cells. EndoC-βH1 cells were treated for 16 hours with or without mevastatin and subsequently for 4 hours with or without mevastatin, recombinant

PCSK9-D374Y (rPCSK9), and/or Alirocumab. **(Panel A)** Cell surface LDLR expression was measured by flow cytometry (*n=9*). In a subset of culture wells, fluorescent LDL was added to the medium for the last 3 hours of the incubation period. LDL uptake was measured by flow cytometry **(panel B)** and visualized by confocal microscopy **(panel C,** a control, b PCSK9, c mevastatin, d PCSK9 + mevastatin) (*n=4*). EndoC-βH1 cells were transfected with a siRNA targeting PCSK9 or a non-targeting control siRNA (siRNA control). On day 3 post-transfection, PCSK9 secretion within 20 hours was measured by ELISA **(panel D),** and LDLR cell surface expression was assessed by flow cytometry **(panel E)** (*n=4*). Results are expressed as mean±SEM, **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001; *****p*<0.0001.



<u>FIGURE 5</u> - PCSK9 does not significantly alter GSIS in human clonal beta cells. EndoC-βH1 cells incubated for 24h in Optiβ2® medium containing 2.8mM glucose were treated with or without mevastatin and rPCSK9. GSIS **(panel A)** and initial insulin contents **(panel B)** were assessed (*n=10*). In a subset of experiments Alirocumab was tested **(panel C)** (*n=3*). EndoC-βH1 cells were transfected with a siRNA targeting PCSK9 or a non-targeting control siRNA (siRNA control). On day 4 post-transfection, GSIS was assessed **(panel D)** (*n=4*).

Alternatively, EndoC-βH1 cells incubated for 24h in Optiβ2® medium containing 2.8mM glucose were treated with or without mevastatin, rPCSK9 and supplemented with 0 or 250 mg/dL of purified human LDL. GSIS **(panel E)** and initial insulin contents **(panel F)** were assessed (*n=7*). *p<0.05 vs. no LDL; ## p<0.01 vs. LDL alone.

***Statement of Originality**

STATEMENT OF ORIGINALITY

This manuscript is an original work that has not been published previously in all or in part. It is not under consideration for publication elsewhere. It has been presented at the recent AHA and at the EAS 2018 scientific session meeting as a moderated poster. The manuscript has been read and approved by all authors.

Effects of Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9 modulation in human pancreatic beta cells function

SUPPLEMENTS

Authors: Stéphane Ramin-Mangata[1]*, Aurélie Thedrez[2,3]*, Valentin Blanchard[1], Nicolas Diotel[1], Brice Nativel[1], Matthieu Wargny[3,4], Audrey Aguesse[2], Stéphanie Billon-Crossouard[2], Cécile Vindis[5], Cédric Le May[3], Philippe Hulin[6], Mathieu Armanet[7], Valery Gmyr[8], François Pattou[8,9], Mikaël Croyal[2], Olivier Meilhac[1], Estelle Nobécourt Dupuy[1,10], Bertrand Cariou[3], and Gilles Lambert[1]

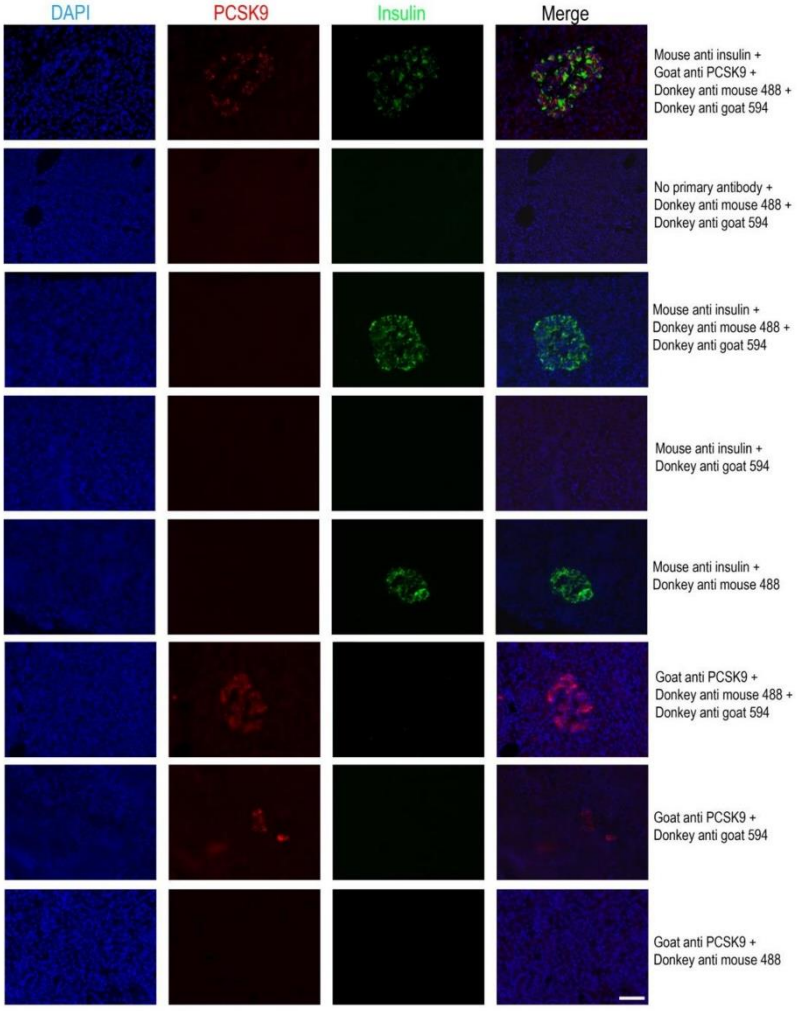
Affiliations: [1]Université de La Réunion, Inserm UMR 1188 DéTROI, Sainte Clotilde, France; [2]Université de Nantes, CRNH Ouest, Inra UMR 1280 PhAN, Nantes, France; [3]L'institut du Thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France; [4]CHU Nantes, INSERM, CIC 1413, Pôle Hospitalo-Universitaire 11: Santé Publique, Clinique des Données, Nantes, F-44093 France; [5]Inserm UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Université de Toulouse, Toulouse, France; [6]Université de Nantes, CHU de Nantes, Inserm UMS 016, Cnrs UMS 3556, Structure Fédérative de Recherche François Bonamy, Micropicell Facility, Nantes, France; [7]Cell Therapy Unit, Hôpital Saint Louis, AP-HP, Université Paris Diderot, Paris, France; [8]European Genomic Institute for Diabetes, Inserm UMR 1190 Translational Research for Diabetes, University of Lille 2, Lille, France; [9]Lille University Hospital, Lille, France ; [10]CHU de La Réunion, Service d'Endocrinologie Nutrition, Saint-Pierre, France.

Corresponding Authors: Pr. Gilles Lambert, Laboratoire Inserm UMR 1188 DéTROI, Plateforme CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, 97490 Sainte Clotilde, France. Tel: + 262 692 437 708; Fax: +262 262 938 237; E-mail: gilles.lambert@univ-reunion.fr

* These authors contributed equally.

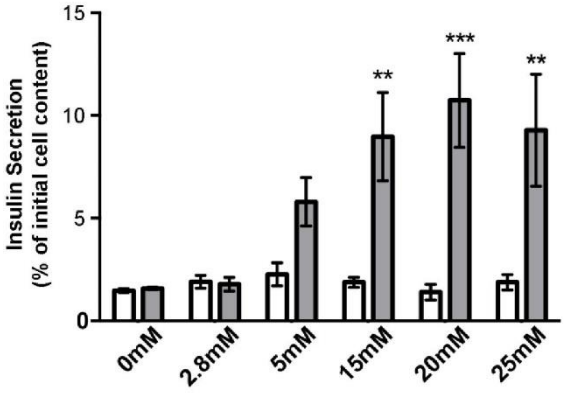
SUPPLEMENTAL METHOD:

Transfections and RT-PCR - SV40 large T antigen specific siRNA sequences were designed using the BLOCK-iTM RNAi Designer (Invitrogen, Carlsbad CA, USA). RNAi-stealth duplex sequences were sense-5'-CAUAAUCAGCCAUACCACAUUUGUA-3' and anti-sense-5'-UACAAAUGUGGUAUGGCUGAUUAUG-3'. Stealth RNAi siRNA negative control med GC duplex was used as negative control (Invitrogen). EndoC-βH1 cells were plated on ECM-fibronectin coated flat bottom 6-well plates (600,000 cells/well) for 18h. Culture medium was replaced with OptiMEM and cells were transfected with 80nM siRNA using Lipofectamine for 3 hours at 37°C (Invitrogen, all). Transfection medium was replaced and cells were grown for an additional 24h (1). Cells were washed in PBS and lifted with trypsin-EDTA. 70,000 cells were set aside to perform RNA isolation. Total mRNA was extracted using the NucleoSpin RNA XS kit (Macherey Nagel, Hoerdt, France) and reverse transcribed using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). Quantitative PCR consisted of 40 cycles (5s at 95°C, 60s at 60°C and 5s at 72°C) using SV40 specific primers 5'-TAATGGACCTTCTAGGTCTTGA-3' and 5'-AATTCTGAAGGAAAGTCCTTG-3', and human beta actin specific primers 5'-TGCTATCCAGGCTGTGCTATCC-3' and 5'- GCCAGGTCCAGACGCAGG-3', on a iCycler iQ system (BioRad, Marnes La Coquette, France) using the SYBR Green MasterMix (Fermentas, Courtaboeuf, France). Gene expression was quantified by the comparative Ct method, in which the amount of target is expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ using human beta actin as housekeeping gene. The remaining cells were used to perform PCSK9 secretion assays. SV40 silencing efficacy and concomitant increase in intracellular insulin content, a key feature of non-dividing beta cells (2), are shown in **Supplemental Figure 3**.

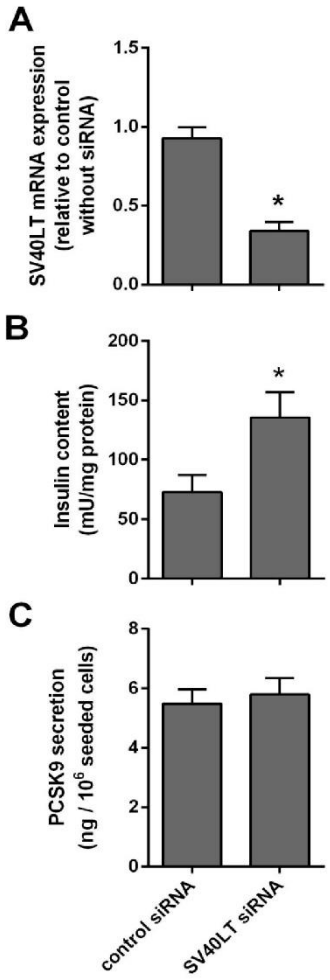


<u>SUPPLEMENTAL FIGURE 1</u> – Assessment of the absence of cross-reactivity between the antibodies used to specifically colocalize insulin and PCSK9. Epifluorescent microscopic analyses of human pancreatic sections immuno-stained with various combinations of the following antibodies: mouse anti human-insulin primary antibody, goat anti human-PCSK9 primary antibody, donkey anti mouse IgG secondary antibody (Alexa 488 fluorescence), and donkey anti goat IgG (Alexa 594 fluorescence). Combinations are indicated on the right-hand side of each line. Nuclei were counterstained with DAPI. The bar indicates 25□m scale for all panels.

<u>SUPPLEMENTAL FIGURE 2</u> - Determination of the optimal concentrations of glucose to assess GSIS. EndoC-βH1 cells incubated in Optiβ2® medium (2.8mM glucose) for 24 hours were placed in βKREBS buffer sequentially without glucose (white bars), and with increasing concentrations of glucose (0, 2.8, 5, 15, 20, and 25mM) (grey bars). Basal insulin secretion and stimulated insulin secretion were calculated and expressed in % of initial insulin cell content. ** $p<0.01$ vs. 0mM glucose. ***$p<0.005$ vs. 0mM glucose. All experiments have been performed at least 3 times.



4



SUPPLEMENTAL FIGURE 3 - (**A**) *SV40LT* mRNA expression in EndoC-βH1 cells 24 hours after transfection with *SV40LT* or control siRNA. (**B**) Intracellular insulin content normalized for cellular proteins in EndoC-βH1 five days post-transfection with SV40LT or control siRNA. (**C**) PCSK9 secretion levels in four hours in EndoC-βH1 cells five days post-transfection with SV40LT or control siRNA. * $p<0.05$ vs. control siRNA. All experiments were performed at least 3 times.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Ihler F, Vetter EV, Pan J, Kammerer R, Debey-Pascher S, Schultze JL, et al. Expression of a neuroendocrine gene signature in gastric tumor cells from CEA 424-SV40 large T antigen-transgenic mice depends on SV40 large T antigen. PloS One. 2012;7(1):e29846.

2. Scharfmann R, Pechberty S, Hazhouz Y, von Bülow M, Bricout-Neveu E, Grenier-Godard M, et al. Development of a conditionally immortalized human pancreatic β cell line. J Clin Invest. 2014 May;124(5):2087–98.

Réponse du journal Atherosclerosis après soumission

Ref.: Ms. No. ATH-D-19-01451
Effects of Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9 modulation in human pancreatic beta cells function
Atherosclerosis or its open access mirror

Dear Dr. RAMIN-MANGATA,

Thank you for submitting your paper to be considered for publication in Atherosclerosis. It has been reviewed and the referees' reports are appended below.

Although some major points of criticism have been raised, the editors have decided that your paper has the potential to be acceptable for publication.

If you are willing to undertake the required work, responding fully and satisfactorily to all the comments and criticisms raised by the reviewers, we would be happy to reconsider the revised manuscript.

You should aim to resubmit your revised paper by 20 May 2020.

Reviewer #1: This research paper is of great interest since it could help to decipher the role of PCSK9 in the new-onset of type 2 diabetes. Nowadays this topic is still under investigation, as it has been shown by Ference BA et al., Lotta LA et al. and Schmidt A.F. et al. who have suggested how PCSK9 variants associated with lower LDL cholesterol could be also associated with an increased risk of type 2 diabetes. Conversely, Sabatine MS et al. as well as Ray KK et al. showed that the inhibition of PCSK9 obtained through the use of monoclonal antibodies did not increase the risk of new-onset diabetes. It is therefore clear that further clinical, in vivo and in vitro studies are needed to clarify the possible causality between PCSK9 and type 2 diabetes risk as well as the underlying molecular mechanisms.
Although the manuscript is clear and the Authors well described the approach they used to investigate the presence and the functionality of PCSK9 at the beta cells level, some comments requiring attention.

Reviewer #2: this manuscript is well written and describes an interesting study on the function of pcsk9 in the pancreas.

Ces travaux ont été soumis à Atherosclerosis et pourraient être acceptés après des révisions. Nous sommes en mesures de répondre à l'ensemble des critiques. Néanmoins, en raison de la crise Covid-19, nous n'avons pas pu finir les travaux avant la date de soutenance. J'effectuerai la suite des travaux dès la levée du confinement.

Discussion et perspectives

Nous avons montré de façon irréfutable dans cette étude que l'expression de PCSK9 au niveau des îlots de Langerhans, est restreinte aux cellules β et que, *in vitro,* des cellules β pancréatiques humaines (EndoC-βH1 et EndoC-βH3) sont capables de sécréter PCSK9. Nous avons ensuite démontré dans les EndoC-βH1 que l'expression et la fonction du LDLR à la membrane plasmique de ces cellules sont diminuées par l'apport exogène de PCSK9 recombinant. De plus, l'ajout d'un traitement avec Alirocumab annule l'effet de PCSK9 sur l'expression du LDLR. De façon rassurante, nous avons montré que ni le traitement avec une statine, ni PCSK9 recombinant ni son inhibition au moyen d'Alirocumab ou d'un mix de 3 siRNA n'altère le GSIS des cellules β pancréatiques, *in vitro*.

Dans notre étude, nous établissons pour la première fois que l'expression de PCSK9 est restreinte au niveau des cellules β humaines. En effet, les observations en microcopie confocale de sections de pancréas humains provenant de 6 donneurs différents font ressortir une colocalisation uniquement entre PCSK9 et insuline. Afin de confirmer nos résultats, nous avons également mis en évidence la synthèse endogène de PCSK9 dans les cellules β pancréatiques. Ainsi, nous avons observé la forme pro-PCSK9 uniquement dans les cellules β pancréatiques. Nous avons aussi effectué une série de contrôles des anticorps pour valider pleinement ces résultats. *In vitro*, nous avons montré que les cellules β pancréatiques EndoC-βH1 et EndoC-βH3 sécrétaient PCSK9. Nous avons également eu des résultats similaires en utilisant des îlots pancréatiques humains isolés. En 2003, l'équipe du Pr. Seidah a montré que l'ARNm de *PCSK9* est exprimé au niveau du pancréas de rat et dans des lignées de cellules β pancréatiques de rat et de souris. Dans une autre étude dirigée par le Pr. Scott, les auteurs ont mis en évidence l'expression de PCSK9 au niveau des cellules β pancréatiques de souris (Seidah et al., 2003; Mbikay et al., 2010). Une récente analyse a également montré clairement l'expression endogène de l'ARNm de *PCSK9* par les cellules β pancréatiques humaines (Ndiaye et al., 2017). Ainsi,

nous sommes la première équipe à démontrer simultanément et de façon irréfutable l'expression, la synthèse et la sécrétion de PCSK9 au niveau des cellules β pancréatiques humaines. Néanmoins, des contradictions persistent au niveau de la littérature puisque la présence de PCSK9 a été observée par d'autres au niveau des cellules δ du pancréas (Langhi et al., 2009; Da Dalt et al., 2018). PCSK9 est une protéine sécrétée et circulante ce qui pourrait expliquer sa présence dans les cellules δ. Ces études n'ont cependant pas investigué la présence de l'ARNm de PCSK9 ni la forme proPCSK9, ce qui est une limite importante. Les discordances observées pourraient aussi être dues aux anticorps utilisés qui diffèrent entre les études.

L'expression et la fonction du LDLR sont positivement régulées par les statines et négativement par PCSK9 (Lambert et al., 2012). En utilisant deux lignées cellulaires de cellules β pancréatiques (EndoC-βH1 et EndoC-βH3), nous avons montré dans ces cellules que la régulation du LDLR est la même dans les cellules β et les hépatocytes humains traités de façon identique. L'ajout d'un inhibiteur de PCSK9 tel qu'Alirocumab ou d'un siRNA dirigé contre PCSK9 abolit l'effet de PCSK9 recombinant et endogène sur le LDLR. Plusieurs études ont montré qu'un traitement avec une statine induit également une augmentation de la sécrétion de PCSK9 (Sahebkar et al., 2015). Ainsi, dans notre étude nous avons étudié l'effet des statines sur la sécrétion de PCSK9. Il en ressort que la sécrétion de PCSK9 par les EndoC-βH1/βH3 et les îlots de pancréatiques isolés était augmentée après un traitement à la mevastatine comme dans les hépatocytes (Dubuc et al., 2004). Dans les hépatocytes, la sécrétion de PCSK9 est sous la dépendance du facteur de transcription SREBP-2 majoritairement et de HNF1-α (Jeong et al., 2008; Dong et al., 2010). Le facteur de transcription gouvernant l'expression de PCSK9 au niveau des cellules β pancréatiques reste encore à déterminer.

Les cellules EndoC-βH1 constituent la seule lignée de cellules β humaines capable de sécréter de l'insuline en réponse à une stimulation au glucose (GSIS) de façon dose dépendante (Weir

and Bonner-Weir, 2011). Cette lignée nous a permis d'investiguer les effets d'un traitement par une statine, de PCSK9 recombinant, d'Alirocumab ou d'un mix de siRNA dirigés contre *PCSK9* sur la sécrétion d'insuline en présence ou en absence de LDL. Ainsi, nous avons pu montrer qu'aucun de ces traitements n'affecte directement le GSIS. Les études du GSIS sur des îlots de Langerhans de souris PCSK9 knockout ou sauvages donnent des résultats comparables (Langhi et al., 2009). Toutefois, dans une étude plus récente, l'équipe du Pr. Norata a montré que l'inactivation totale de *Pcsk9* dans un modèle murin induit une accumulation de cholestérol dépendante du LDLR dans les îlots pancréatiques associée à une altération de la fonctionnalité des cellules β. En effet, le contenu en insuline de ces cellules était augmenté et l'insulinémie des souris était diminuée. En revanche, l'inaction spécifique de *Pcsk9* hépatique, responsable à 99% de la concentration en PCSK9 plasmatique, n'a altéré ni la fonctionnalité des cellules β ni l'insulinémie (Lagace et al., 2006; Da Dalt et al., 2018). Ces données suggèrent un effet protecteur de la forme PCSK9 pancréatique sur la fonctionnalité des cellules β chez la souris.

Une des forces de notre étude est la détection *in situ* de PCSK9 dans des sections histologiques de pancréas humain. En effet, les études antérieures concernant l'implication de PCSK9 au niveau du pancréas ont été réalisées sur des souris (*in vivo* et *ex vivo)* soit chez l'Homme *ex vivo* sur des îlots pancréatiques isolés en culture (Langhi et al., 2009; Mbikay et al., 2010; Da Dalt et al., 2018). Il aurait été intéressant de travailler également avec des sections de pancréas de patients diabétiques afin d'évaluer s'il existe ou non des différences d'expression de PCSK9 à ce niveau dans un contexte de diabète.

Des études cliniques ont rapporté une association entre un traitement avec une statine à forte dose sur une longue période et l'apparition de DT2 (Ridker et al., 2012). De plus, les données d'études Mendéliennes randomisées font ressortir une association positive entre les formes « pertes de fonctions » de *PCSK9* ou de *l'HMGCR* et le risque de DT2 (Ference et al., 2016; Lotta et al., 2016; Schmidt et al., 2017, 2019). Nous avons montré l'absence d'effet des statines,

de PCSK9 recombinant et de l'inhibition de PCSK9 par Alirocumab ou des siRNA ciblant PCSK9 sur le GSIS. Néanmoins, ces conclusions peuvent être limitées par le fait que dans nos conditions expérimentales les traitements sont aigus et ne reflètent pas la chronicité des traitements des patients. Par ailleurs, l'absence d'effet de nos traitements sur le GSIS n'exclut pas qu'il pourrait exister un rôle protecteur de PCSK9 pancréatique dans le microenvironnement au niveau du pancréas comme suggéré par les travaux de l'équipe du Pr. Norata. Dans cette étude, ils ont observé *in vivo* une baisse de l'insulinémie chez des souris *Pcsk9* knockout associée à une augmentation des contenus en cholestérol et en insuline dans les îlots pancréatiques. Dans nos travaux, nous avons travaillé *in vitro* uniquement avec une population unique de cellules β. L'effet de PCSK9 sur la sécrétion d'insuline pourrait donc être dépendant de la présence des autres cellules du pancréas (α, δ, PP, etc…). Par exemple, la somatostatine sécrétée par les cellules δ agit directement sur les cellules β et diminue la sécrétion d'insuline (DiGruccio et al., 2016). PCSK9, sécrété par les cellules β, pourrait agir sur les cellules proches et induire ou inhiber la libération de facteurs régulant la sécrétion d'insuline. Dans ces conditions, le rôle paracrine/autocrine et protecteur de PCSK9 pancréatique serait indirect.

En conclusion, dans notre étude, nous avons montré pour la première fois que la protéine PCSK9 est exprimée, synthétisée et sécrétée par les cellules β pancréatiques humaines. Nous avons également démontré que l'expression et la fonction du LDLR à la surface des cellules β sont régulées par un traitement avec une statine ou du PCSK9 recombinant et que cet effet est aboli par Alirocumab. Il ressort de notre étude que les traitements avec une statine, PCSK9 ou une inhibition de PCSK9 n'altèrent pas le GSIS. Ces résultats sont rassurants concernant l'inhibition de PCSK9 au moyen d'anticorps monoclonaux.

Discussion et perspectives

Les médicaments hypolipémiants, que sont les statines, ont montré une très grande efficacité et un bénéfice indiscutable face aux maladies cardiovasculaires (Rosenson and Tangney, 1998; Toth et al., 2018a). Néanmoins, leur efficacité est limitée par le paradoxe des statines. En effet, un traitement par une statine induit une augmentation de l'expression du récepteur aux LDL en activant SREBP-2. PCSK9, l'inhibiteur naturel du récepteur aux LDL, est également sous la dépendance de ce même facteur de transcription. Ainsi, un traitement par une statine augmente l'expression du récepteur aux LDL ce qui entraine une diminution des taux de LDL circulants. Cependant, cet effet bénéfique est limité par la surexpression concomitante de PCSK9. De ce fait, la diminution des taux de LDL-C n'est pas proportionnelle à la dose de statine (Dubuc et al., 2004; Jeong et al., 2008; Sahebkar et al., 2015). Les doses de statines prescrites dépendent de valeurs cibles de LDL-C à atteindre définies en fonction de la gravité de la maladie cardiovasculaire et des facteurs de risque du patient. Ces valeurs cibles varient entre 1,16g/L pour les patients à bas risque cardiovasculaire et 0,55g/L pour les patients à très haut risque cardiovasculaire (Mach et al., 2019).

Les statines font diminuer significativement les maladies cardiovasculaires et les décès qui y sont liés. Toutefois, il a été rapporté dans plusieurs études que l'utilisation de statines à forte dose chez des individus prédisposés pouvait induire un risque faible mais significatif d'apparition du diabète de type 2 (Ridker et al., 2012; Wang et al., 2012; Crandall et al., 2017). D'autres équipes et nous-même, avons mis en évidence une corrélation entre PCSK9 et les indices d'insulinorésistance HOMA-IR et de fonctionnalité des cellules β pancréatiques HOMA-β suggérant une implication directe ou indirecte de PCSK9 dans la pathologie du diabète de type 2 (Baass et al., 2009; Lakoski et al., 2009; Cui et al., 2010; Werner et al., 2014). Cette hypothèse est confortée par plusieurs études de la littérature qui établissent également un lien entre PCSK9 et l'insuline, la glycémie, les cellules β pancréatiques et le diabète de type 2. Premièrement, l'ARN messager de *PCSK9* a été retrouvé au niveau des cellules β (Seidah et

al., 2003). Ensuite, il a été rapporté que les niveaux de PCSK9 augmentent en présence d'insuline et qu'en absence de PCSK9 les niveaux d'insuline diminuent. De plus, chez des souris *Pcsk9* knockout la glycémie à jeun est augmentée par rapport à des souris contrôles sauvages (Costet et al., 2006; Mbikay et al., 2010; Miao et al., 2015). Enfin, des études Mendéliennes randomisées ont mis en évidence une corrélation positive entre les variants LOF de *PCSK9* et l'apparition du diabète de type 2 (Ference et al., 2016; Lotta et al., 2016; Schmidt et al., 2017).

Dans ces mêmes études Mendéliennes randomisées, une corrélation positive a été mise en évidence entre des variants GOF du récepteur aux LDL ou LOF de l'HMG-CoA réductase et l'apparition du diabète de type 2. L'engorgement en cholestérol des cellules β pancréatiques pourrait expliquer l'apparition du diabète de type 2 après traitement avec une statine. Des travaux antérieurs concernant les effets du cholestérol sur la sécrétion d'insuline sont à l'origine de cette hypothèse. En 2007, des souris *ApoE* knockout, *ob/ob* et contrôles ont été nourries avec un régime riche en cholestérol. Des analyses de la sécrétion d'insuline suite à une stimulation au glucose réalisées à partir d'îlots de Langerhans de ces souris ont montré une diminution de la sécrétion d'insuline chez les souris *ApoE* knockout et *ob/ob* qui présentaient un taux de cholestérol élevé dans leurs îlots (Hao et al., 2007). En 2008, la sur-activation de SREBP-2 humain responsable de l'expression du récepteur aux LDL a également entrainé une accumulation de cholestérol au niveau des îlots de Langerhans chez la souris et une diminution du GSIS (Ishikawa et al., 2008). Enfin en 2015, dans l'étude d'une cohorte de patients hypercholestérolémiques familiaux avec une perte de fonction du récepteur aux LDL, la prévalence du diabète de type 2 était diminuée de moitié par rapport aux membres sains des familles de ces patients (Besseling et al., 2015).

Ainsi, l'hypothèse et les objectifs de ma thèse ont émergé à partir de l'ensemble de ces éléments de la littérature. Notre hypothèse de travail était que l'engorgement en cholestérol des cellules

β pancréatiques serait à l'origine d'un dysfonctionnement cellulaire au niveau des cellules β. **Nous avons voulu déterminer (i) dans quelle mesure les statines régulent la sécrétion de PCSK9 chez des patients diabétiques de type 2 ou non diabétiques ; (ii) si PCSK9 est prédictif ou non de la survenue du diabète de type 2 ; (iii) quels sont les effets des statines, de PCSK9 et de son inhibition (par Alirocumab ou siRNAs) sur le GSIS en présence ou non de LDL.**

Afin de répondre à ces différents objectifs nous avons utilisé 3 cohortes composées de 1 745 patients à haut risque cardiovasculaire dont 48% de diabétiques de type 2 pour Illuminate, 2 100 individus sains en population générale pour ELSA-Brasil et 303 patients prédiabétiques pour IT-DIAB. De plus, nous avons travaillé sur des sections de pancréas humains provenant de 6 donneurs sains et des îlots de Langerhans isolés provenant de 2 donneurs d'organes. Nous avons également réalisé nos études sur les deux seules lignées de cellules β pancréatiques humaines, les EndoC-βH1 et les EndoC-βH3, qui sécrètent de l'insuline de façon dose dépendante suite à une stimulation au glucose (Ravassard et al., 2011; Benazra et al., 2015).

Dans la cohorte Illuminate, l'objectif était d'étudier la modulation des niveaux de PCSK9 par les statines. Ainsi, nous avons montré que les statines induisent une augmentation des taux de PCSK9 circulants de façon relativement dose dépendante. Cette étude prospective nous a aussi permis de mettre en évidence que les concentrations de PCSK9 sont plus élevées chez les patients diabétiques de types 2 comparés à des patients non diabétiques et qu'il existe une corrélation positive entre PCSK9 et la glycémie, l'insulinémie et l'HOMA-IR. Néanmoins, nous ne savions pas si les niveaux élevés de PCSK9 étaient la cause ou la conséquence du diabète de type 2 ni s'il s'agissait d'une implication directe ou non de PCSK9 dans cette pathologie. Deux interrogations majeures de ma thèse ont découlé de ces observations. (i) Est-ce que PCSK9 serait prédictif ou non de la survenue du diabète de type 2 ? (ii) Est-ce que les niveaux bas de PCSK9, induits par son inhibition, favoriseraient l'apparition du diabète de type

2 ? En effet, les études Mendéliennes randomisées démontrent une association entre les formes LOF de PCSK9 et le diabète de type 2.

Pour répondre à la première question, nous avons dosé PCSK9 dans le plasma des patients des cohortes ELSA-Brasil et IT-DIAB au moment de l'inclusion. Après 4 à 5 ans de suivi, nous avons déterminé les corrélations existantes entre PCSK9 et la survenue du diabète de type 2 et des paramètres du métabolisme glucidiques. Il est ressorti de cette étude longitudinale que les niveaux bas de PCSK9 ne sont pas prédictifs de la survenue du diabète de type 2 mais qu'au contraire les niveaux élevés de PCSK9 sont associés à une altération de la glycémie à jeun et à une augmentation de l'insulinorésistance au bout de 5 ans.

En parallèle, nous avons utilisé une approche de biologie cellulaire afin de répondre à la seconde question. Nous avons voulu déterminer le rôle de PCSK9 et les effets de la modulation du récepteur aux LDL par les statines et les inhibiteurs de PCSK9 sur le GSIS dans les cellules β pancréatiques. En 2003, le Pr. Seidah et ses collègues ont rapporté que l'ARNm de *PCSK9* est présent au niveau des cellules β de rats et de souris mais aucune donnée n'était disponible sur l'expression de *PCSK9* au niveau des cellules β pancréatiques humaines (Seidah et al., 2003). En réalisant un tri cellulaire au niveau des îlots de Langerhans humains, nous avons montré que les niveaux d'ARNm de *PCSK9* étaient plus élevés dans la population cellulaire enrichie en cellules β comparée aux cellules d'îlot total ou aux cellules d'ïlots autres que les cellules β (Ramin-Mangata et al., 2018). Nous avons montré pour la première fois en étudiant des sections de pancréas humain que PCSK9 est exprimé et synthétisé uniquement dans les cellules β pancréatiques. Cette observation fut confortée par le dosage de PCSK9 endogène dans les surnageants de culture d'îlots humains isolés et dans le surnageant des lignées EndoC-βH1 et des EndoC-βH3. De plus, nous avons démontré que l'expression et la fonction du récepteur aux LDL au niveau de la membrane plasmique des cellules β étaient modulées par un traitement

avec PCSK9 recombinant et par des statines. Toutefois, nous n'avons pas observé d'effet de PCSK9 recombinant, des statines ou des inhibiteurs de PCSK9 sur le GSIS

Nous avons donc montré dans ce travail de thèse que les niveaux de PCSK9 sont significativement augmentés chez les patients diabétiques de type 2. Dans notre étude longitudinale, nous aussi avons montré que les niveaux élevés de PCSK9 sont associés à une altération de la glycémie et une augmentation de l'HOMA-IR (Ramin-Mangata et al., 2020). En parallèle, nous avons démontré que le traitement de cellules β pancréatiques avec PCSK9 recombinant n'altère pas le GSIS. L'ensemble de ces observations suggère que les niveaux élevés de PCSK9 pourraient être une conséquence du développement du diabète de type 2 et non une cause. Cette augmentation pourrait être due à l'insuline. En effet, il a été rapporté par Miao et ses collègues que l'inactivation du récepteur à l'insuline uniquement au niveau du foie entraîne une diminution de 55% à 75% des niveaux de PCSK9 suggérant ainsi que l'insuline induit l'expression de PCSK9. Lors de leur étude, ils ont également traités des souris sauvages à la streptozotocine pour provoquer la destruction des cellules β ou traités des souris *ob/ob* avec un oligonucléotide anti-sens dirigé contre l'insuline. Après ces traitements, les niveaux de PCSK9 ont chuté de 78% à 88% pour le traitement à la streptozotocine et de 65% pour le traitement avec l'oligonucléotide anti-sens (Miao et al., 2015). De plus, la mise à jeun de souris pendant 24h, et donc la diminution de l'insulinémie, induit une réduction de 73% le niveau d'ARNm de *PCSK9* se traduisant par une baisse de moitié de la concentration circulante de PCSK9 (Costet et al., 2006). Une des caractéristiques du diabète de type 2 est l'insulinorésistance. Celle-ci survient lorsque l'insuline ne suffit plus à réguler la glycémie. Pour faire face à cette résistance, les cellules β pancréatiques sécrètent d'avantage d'insuline (Ferrannini et al., 1997; Pessin and Saltiel, 2000). Ainsi, la sur-sécrétion d'insuline pourrait expliquer l'augmentation des niveaux circulants de PCSK9 chez les personnes diabétiques de

type 2 et expliquer les corrélations que nous observons entre PCSK9 et l'HOMA-IR et l'altération de la glycémie.

Une des forces de mes travaux est l'utilisation exclusive d'échantillons d'origine humaine ou de lignées de cellules humaines. En effet, nous avons utilisé 3 cohortes de patients, des sections de pancréas humain et, des îlots de Langerhans isolés et des cellules EndoC-βH1 et EndoC-βH3 issus de pancréas humains. De nombreux paramètres cliniques et biologiques disponibles nous ont permis de corréler PCSK9 et les paramètres glucidiques. Néanmoins, des collectes de plasma de façon annuelle auraient permis de renforcer la direction de nos conclusions. Dans ces travaux, nous avons démontré pour la première fois que PCSK9 est uniquement exprimé au niveau des cellules β pancréatiques chez l'Homme. Premièrement, en tri cellulaire nous avons montré que le niveau d'expression de l'ARNm de *PCSK9* était augmenté dans une population cellulaire enrichie en cellules β pancréatiques. Ensuite, sur des coupes de pancréas humains, nous avons observé une colocalisation entre PCSK9 et insuline. Nous avons effectué tous les contrôles et croisements possibles des anticorps afin d'affirmer la robustesse de ces observations. Enfin, nous avons également montré que la forme pro-PCSK9 était présente dans les cellules β pancréatiques confirmant sa synthèse endogène par ces cellules. La fonction exacte de PCSK9 à ce niveau reste cependant à déterminer. Nos résultats ne montrent pas mais n'excluent pas non plus que PCSK9 puisse localement exercer un rôle protecteur au niveau de la cellule β. En effet, l'accumulation de cholestérol dans les cellules β pancréatiques est délétère et entraîne l'apoptose de ces cellules (Kruit et al., 2010a). Dans notre étude, nous avons montré que PCSK9 induit la diminution de l'expression du récepteur aux LDL au niveau de la surface des cellules β ce qui pourrait empêcher leur engorgement en cholestérol et donc l'altération du GSIS. *In vitro,* nous avons travaillé avec la seule lignée de cellules β pancréatiques humaines sécrétant de l'insuline suite à une stimulation au glucose de façon dose dépendante (Ravassard

et al., 2011; Weir and Bonner-Weir, 2011). Dans la limite des conditions expérimentales compatibles avec la culture de cette lignée, nous n'avons pas observé d'effet de PCSK9 sur le GSIS. Néanmoins, dans notre modèle nous n'avons ni évalué le système du transport du cholestérol ni l'intervention des HDL pour son efflux (Brunham et al., 2007; Kruit et al., 2010b, 2011). Une étude du rôle des transporteurs de type ABC et des HDL dans le GSIS en présence de LDL pourrait être complémentaire.

L'équipe du Pr. Norata a montré que l'inactivation de Pcsk9 totale mais pas hépatique induit une dysfonction des cellules β. Ces résultats suggèrent une absence d'effet de PCSK9 plasmatique mais un effet protecteur de PCSK9 pancréatique sur la fonctionnalité des cellules β (Da Dalt et al., 2018). En lien avec cette étude, nos résultats ouvrent une perspective sur l'action paracrine de PCSK9 au niveau des îlots de Langherans. Néanmoins, des résultats opposés existent dans la littérature. En effet, il a également été rapporté chez des îlots isolés de souris que l'inactivation totale de *Pcsk9* n'altère pas la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation au glucose (Langhi et al., 2009). Est-ce que le rôle de PCSK9 dans la sécrétion d'insuline est dépendant des cellules autres que les cellules β dans le pancréas ? Pour répondre à cette question et statuer sur le rôle de PCSK9 au niveau du pancréas, il serait possible d'étudier la sécrétion d'insuline suite à une stimulation au glucose dans un modèle où PCSK9 est inactivé spécifiquement au niveau pancréatique **(Figure 43)**

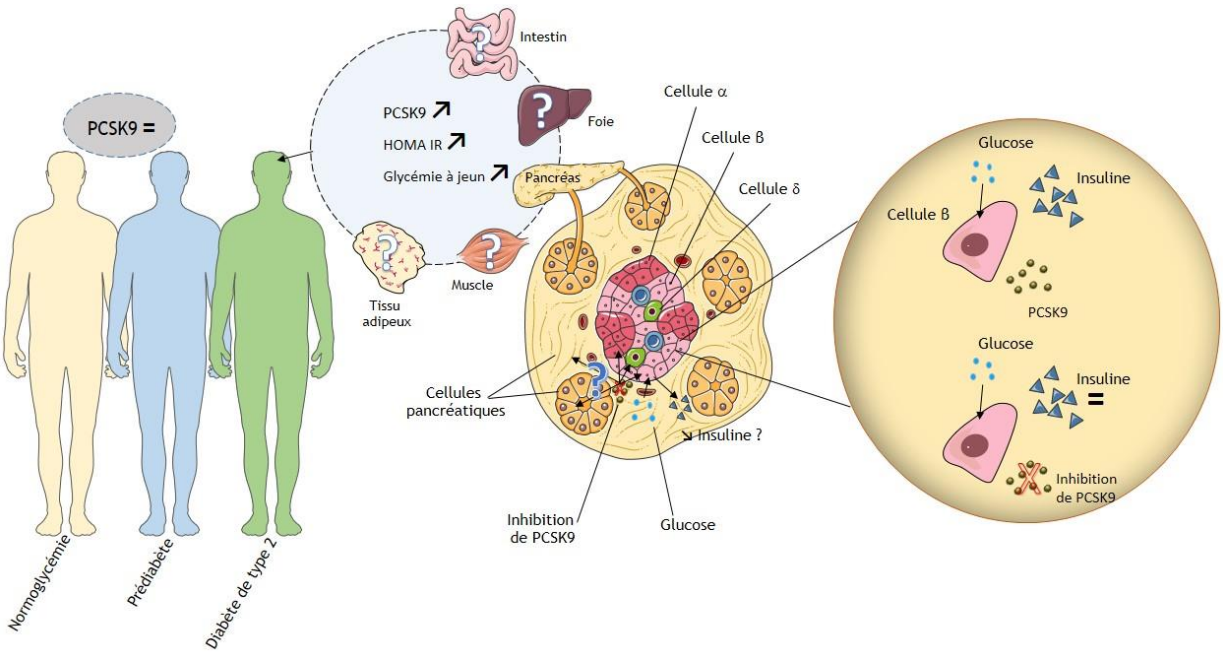


Figure 43 : Le rôle de PCSK9 pancréatique (Stéphane RAMIN-MANGATA). In vitro, les cellules β humaines expriment et sécrètent PCSK9. Suite à une stimulation au glucose ces cellules sécrètent l'insuline. L'inhibition de PCSK9 dans les cellules β seules n'altère pas la sécrétion d'insuline. En revanche, l'inhibition de PCSK9 dans le microenvironnement pancréatique pourrait diminuer la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation au glucose. PCSK9 pourrait agir sur les cellules autres que les cellules β et ainsi moduler indirectement la sécrétion d'insuline des cellules β.

Dans plusieurs études incluant les nôtres, les concentrations en PCSK9 plasmatiques sont corrélées à l'insulinorésistance et à l'altération de la glycémie (Baass et al., 2009; Lakoski et al., 2009; Cui et al., 2010; Werner et al., 2014; Arsenault et al., 2018; Ramin-Mangata et al., 2020). Ainsi, il ne faut pas exclure un rôle possible de PCSK9 plasmatique dans les détériorations du métabolisme glucidique au niveau périphérique (foie, muscle, tissu adipeux).

En conclusion de ces travaux, nous avons montré que la concentration plasmatique en PCSK9 est augmentée chez les diabétiques de type 2. Nous avons également montré que les taux bas de PCSK9 ne sont pas prédictifs de la survenue du diabète de type 2. Au

contraire, les taux élevés de PCSK9 sont associés avec une augmentation de la glycémie à jeun et de l'insulinorésistance. Dans le pancréas, PCSK9 est exprimé uniquement dans les cellules β des îlots de Langerhans. Dans nos conditions expérimentales, PCSK9 réduit l'internalisation de LDL en diminuant l'expression du récepteur aux LDL à la membrane plasmique des cellules β. Nous n'avons pas observé d'effet des statines, de PCSK9 ou de l'inhibition de PCSK9 par Alirocumab ou des siRNAs sur la sécrétion d'insuline suite à une stimulation au glucose. Ces résultats sont rassurants à l'égard du développement et de l'utilisation des inhibiteurs de PCSK9 qui inhibent uniquement la forme circulante de PCSK9.

Annexes

Stéphane RAMIN-MANGATA
La Réunion, FRANCE
✉ ramin.stephane@hotmail.fr

Compétences en laboratoire

- ✓ Culture cellulaire
- ✓ ELISA
- ✓ Histologie
- ✓ Western Blot & Dot Blot
- ✓ Microbiologie (identification, banque de souche, dénombrement)
- ✓ Approches pharmacologiques hypolipémiantes (statines, anticorps monoclonaux anti-PCSK9, siRNA)
- ✓ Cytométrie en flux
- ✓ Isolement PMBCs
- ✓ PCR
- ✓ Gene silencing (siRNA, miRNA)
- ✓ Etude de cohortes (ELSA-BRASIL & IT-DIAB)
- ✓ Etude de la fonction des cellules β pancréatiques humaines (sécrétion d'insuline, expression et fonction du récepteur aux LDL)

Parcours détaillé depuis l'obtention du Baccalauréat

2016-Présent **Thèse de Doctorat mention biologie santé et biochimie :** Le rôle du récepteur aux LDL et de PCSK9 dans le diabète de type 2
Université de La Réunion (Contrat Ecole Doctorale (MESR) + 34200€ Fondation de la Recherche Médicale)
Représentant des doctorants à l'école doctorale (2018-2020)

2014-2016 **Master en biologie santé : Processus infectieux et inflammatoires**
Mention bien, 1er (parmi les étudiants scientifiques)
Université de La Réunion

2012-2014 **Licence de biochimie**
7e/30, Université de La Réunion

2010-2012 **Brevet de technicien supérieur en bio-analyses et contrôles**
2e/15 Lycée St Paul IV, La Réunion

2007-2010 **Baccalauréat Sciences et technologies de laboratoire**
Mention assez bien
Lycée St Paul IV, La Réunion

Stages et formations suivis

Juillet 2019 (10 jours) **Stage d'observation volontaire en milieu hospitalier :** Chirurgie vasculaire et thoracique, Consultation externe en endocrinologie
CHU Nord, La Réunion

Fév-Juil 2017	**Formation : Culture cellulaire des Endoc-βH1 (Cellules β pancréatiques humaines) :** Captage de LDL et expression du récepteur aux LDL après traitements hypolipémiants INSERM UMR 1087 / CNRS UMR 6291, L'institut du thorax, Nantes
Jan-Juin 2016	**Stage recherche (Master 2) :** Déterminer la prévalence et les caractéristiques des Entérobactéries produisant des bêta-lactamases à spectre étendu Partenariat CIRAD, CHU Nord et CHU Sud, La Réunion
Jan-Mar 2015	**Stage recherche (Master 1) :** Etude des interactions entre CD93 et ses ligands potentiels INSERM U1187, CNRS UMR 9192, IRD UMR 249, PIMIT, La Réunion
Jan-Mar 2012	**Stage (STS 2) :** Mise en place d'un plan correctif pour la détermination de l'azote total dans les eaux usées par la méthode de Kjeldahl Qwalilab, La Réunion
Juin-Juil 2011	**Stage (STS 1) :** Mise en place d'une mesure de pH de l'eau validée et standardisée Qwalilab, La Réunion

Enseignements dispensés

Mars 2020	**Master 1 (Biologie Santé) - Cycle de séminaire (1 heure)** PCSK9 comme biomarqueur du diabète ?
	Jury de soutenance de fin de stage Master 1 Biologie Santé
Jan-Juin 2019	**Licence 1 (Science pour la santé) - Biologie des membranes UE8.S2 (12 heures)** Introduction de la cellule et des organites possédant une membrane Organisation et fonction des membranes Transport membranaire Potentiel membranaire Système endo-membranaire Synthèse des protéines et insertion dans la membrane Glycosylation des protéines membranaires Transport vésiculaire Membrane des bactéries et virus Application : liposome, cytométrie en flux, sécrétion d'insuline par la cellule β
	Licence 1 (Science pour la santé) - Métabolismes et bioénergétiques UE10.S2 (48 heures) TD Thermodynamique TD Devenir du pyruvate et cycle de Krebs TD Phosphorylation oxydative TD Métabolisme oxydatif du glucose

Master 1 (Biologie santé) – Cycle de séminaire (2 heures)
Rôle du récepteur aux LDL et de PCSK9 dans le diabète de type 2 (traitements hypolipémiants et sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques humaines)

Mai-Juin 2015

Lycée Saint Paul IV (enseignant contractuel)
Première STL - Biotechnologies (TP et cours)
Acides nucléiques
Utilisation du matériel de laboratoire de base
Dosages biochimiques
PCR

Première STL - Informatique appliquée en biologie
Traitement des données obtenues en TP
Gamme étalon et détermination des concentrations des essais

Autre expérience professionnelle

Juil 2011

Technicien en analyses des propriétés physico-chimiques de l'eau
Qwalilab, La Réunion

Publications scientifiques

13. Expression and function of PCSK9 in human pancreatic beta cells.
Stéphane Ramin-Mangata, Aurélie Thedrez, Valentin Blanchard, Nicolas Diotel, Brice Nativel, Matthieu Wargny, Audrey Aguesse, Stéphanie Billon-Crossouard, Cécile Vindis, Cédric Le May, Philippe Hulin, Mathieu Armanet, Valery Gmyr, François Pattou, Mikaël Croyal, Olivier Meilhac, Estelle Nobécourt Dupuy, Bertrand Cariou, and Gilles Lambert. En révision, Atherosclerosis

12. Circulating PCSK9 levels are not associated with the conversion to type 2 diabetes.
Ramin-Mangata S, Wargny M, Pichelin M, Le May C, Thédrez A, Blanchard V, Nativel B, Santos RD, Benseñor IM, Lotufo PA, Lambert G, Cariou B. Atherosclerosis. 2020. 293, 49-56

11. CD93 is a cell surface lectin receptor involved in the control of the inflammatory response stimulated by exogenous DNA.
Nativel B, **Ramin-Mangata S**, Mevizou R, Figuester A, Andries J, Iwema T, Ikewaki N, Gasque P, Viranaïcken W. Immunology. 2019. 158(2), 85-93

10. Reduced Lipoprotein(a) associated with the apolipoprotein E2 genotype confers cardiovascular protection in Familial Hypercholesterolemia
V. Blanchard, M. Croyal, I. Khantalin, **S. Ramin-Mangata**, K. Chemello, B. Nativel, DJ Blom, A.D. Marais, G. Lambert. JACC Basic Transl Sci. 2019. 24, 425-427

9. PCSK9: from biology to clinical applications.
Blanchard V, Khantalin I, **Ramin-Mangata S**, Chémello K, Nativel B, Lambert G. Pathology. 2018. 51, 177-183

8. Key aspects of PCSK9 inhibition beyond LDL lowering.
Ramin-Mangata S, Blanchard V, Lambert G. Curr Opin Lipidol. 2018. 29, 453-458

7. PCSK9 inhibition with alirocumab reduces lipoprotein(a) levels in nonhuman primates by lowering apolipoprotein(a) production rate.
Croyal M, Tran TT, Blanchard RH, Le Bail JC, Villard EF, Poirier B, Aguesse A, Billon-Crossouard S, **Ramin-Mangata S**, Blanchard V, Nativel B, Chemello K, Khantalin I, Thedrez A, Janiak P, Krempf M, Boixel C, Lambert G, Guillot E. Clin Sci (Lond). 2018. 132, 1075-1083

6. Kinetics of plasma apolipoprotein E isoforms by LC-MS/MS: a pilot study.
Blanchard V, **Ramin-Mangata S**, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Durand M, Chemello K, Nativel B, Flet L, Chétiveaux M, Jacobi D, Bard JM, Ouguerram K, Lambert G, Krempf M, Croyal M. J Lipid Res. 2018. 59, 892-900

5. Homozygous FH Patients with Identical Mutations Variably Express the LDL Receptor: Implications for the Efficacy of Evolocumab.
Aurélie Thedrez, Dirk Blom, **Stephane Ramin-Mangata**, Valentin Blanchard, Mikaël Croyal, Kevin Chemello, Brice Nativel, Matthieu Pichelin, Bertrand Cariou, Steeve Bourane, Lihua Tang, Michel Farnier, Frederick Raal, and Gilles Lambert. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018. 38, 592-598

4. Effect of atorvastatin, cholesterol ester transfer protein inhibition, and diabetes mellitus on circulating proprotein subtilisin kexin type 9 and lipoprotein(a) levels in patients at high cardiovascular risk.
Arsenault BJ, Petrides F, Tabet F, Bao W, Hovingh GK, Boekholdt SM, **Ramin-Mangata S**, Meilhac O, DeMicco D, Rye KA, Waters DD, Kastelein JJP, Barter P, Lambert G. J Clin Lipidol. 2017. 12, 130-136

3. Fenofibrate decreases plasma ceramide in type 2 diabetes patients: A novel marker of CVD?
Croyal M, Kaabia Z, León L, **Ramin-Mangata S**, Baty T, Fall F, Billon-Crossouard S, Aguesse A, Hollstein T, Sullivan DR, Nobecourt E, Lambert G, Krempf M. Diabetes Metab. 2017. 44, 143-149

2. Risk Factors of Extended-Spectrum β-Lactamase Producing Enterobacteriaceae Occurrence in Farms in Reunion, Madagascar and Mayotte Islands, 2016-2017.
Gay N, Leclaire A, Laval M, Miltgen G, Jégo M, **Stéphane R**, Jaubert J, Belmonte O, Cardinale E. Vet Sci. 2018

1. The complexity of lipoprotein (a) lowering by PCSK9 monoclonal antibodies.
Lambert G, Thedrez A, Croyal M, **Ramin-Mangata S**, Couret D, Diotel N, Nobécourt-Dupuy E, Krempf M, LeBail JC, Poirier B, Blankenstein J, Villard EF, Guillot E. Clin Sci (Lond). 2017. 131, 261-268

Participation à des congrès

ORAL – American Heart Association 2019 (Philadelphie) – Expression and function of PCSK9 in human pancreatic beta cells

POSTER – American Heart Association 2019 (Philadelphie) - Circulating PCSK9 levels are not associated with the conversion to type 2 diabetes

ORAL - European Atherosclerosis Society 2018 (Lisbonne) – LDL Receptor expression and LDL uptake in human pancreatic beta cells are regulated by statins and PCSK9 – Consequence for glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). Obtention du prix : Young Investigator Fellowship

Références bibliographiques

Abel, E.D., Peroni, O., Kim, J.K., Kim, Y.B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G.I., and Kahn, B.B. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. Nature *409*, 729–733.

Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J.-P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., et al. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. Nat. Genet. *34*, 154–156.

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.

Altmann, S.W., Davis, H.R., Zhu, L.-J., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P.N., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., et al. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. Science *303*, 1201–1204.

American Diabetes Association (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care *37 Suppl 1*, S81-90.

Arsenault, B.J., Petrides, F., Tabet, F., Bao, W., Hovingh, G.K., Boekholdt, S.M., Ramin-Mangata, S., Meilhac, O., DeMicco, D., Rye, K.-A., et al. (2018). Effect of atorvastatin, cholesterol ester transfer protein inhibition, and diabetes mellitus on circulating proprotein subtilisin kexin type 9 and lipoprotein(a) levels in patients at high cardiovascular risk. J Clin Lipidol *12*, 130–136.

Avis, H.J., Hutten, B.A., Gagné, C., Langslet, G., McCrindle, B.W., Wiegman, A., Hsia, J., Kastelein, J.J.P., and Stein, E.A. (2010). Efficacy and safety of rosuvastatin therapy for children with familial hypercholesterolemia. J. Am. Coll. Cardiol. *55*, 1121–1126.

Awan, Z., Seidah, N.G., MacFadyen, J.G., Benjannet, S., Chasman, D.I., Ridker, P.M., and Genest, J. (2012). Rosuvastatin, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 concentrations, and LDL cholesterol response: the JUPITER trial. Clin. Chem. *58*, 183–189.

Baass, A., Dubuc, G., Tremblay, M., Delvin, E.E., O'Loughlin, J., Levy, E., Davignon, J., and Lambert, M. (2009). Plasma PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in a population-based sample of children and adolescents. Clin. Chem. *55*, 1637–1645.

Ballantyne, C.M., Neutel, J., Cropp, A., Duggan, W., Wang, E.Q., Plowchalk, D., Sweeney, K., Kaila, N., Vincent, J., and Bays, H. (2015). Results of Bococizumab, A Monoclonal Antibody Against Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9, from a Randomized, Placebo-Controlled, Dose-Ranging Study in Statin-Treated Subjects With Hypercholesterolemia. The American Journal of Cardiology *115*, 1212–1221.

Benazra, M., Lecomte, M.-J., Colace, C., Müller, A., Machado, C., Pechberty, S., Bricout-Neveu, E., Grenier-Godard, M., Solimena, M., Scharfmann, R., et al. (2015). A human beta cell line with drug inducible excision of immortalizing transgenes. Mol Metab *4*, 916–925.

Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M.-C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D., et al. (2004). NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. J. Biol. Chem. *279*, 48865–48875.

Benjannet, S., Rhainds, D., Hamelin, J., Nassoury, N., and Seidah, N.G. (2006). 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. *281*, 30561–30572.

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.

Besseling, J., Kastelein, J.J.P., Defesche, J.C., Hutten, B.A., and Hovingh, G.K. (2015). Association between familial hypercholesterolemia and prevalence of type 2 diabetes mellitus. JAMA *313*, 1029–1036.

Betteridge, D.J., and Carmena, R. (2016). The diabetogenic action of statins — mechanisms and clinical implications. Nature Reviews Endocrinology *12*, 99–110.

Blanchard, V., Khantalin, I., Ramin-Mangata, S., Chémello, K., Nativel, B., and Lambert, G. (2018). PCSK9: from biology to clinical applications. Pathology.

Blom, D.J., Hala, T., Bolognese, M., Lillestol, M.J., Toth, P.D., Burgess, L., Ceska, R., Roth, E., Koren, M.J., Ballantyne, C.M., et al. (2014). A 52-Week Placebo-Controlled Trial of Evolocumab in Hyperlipidemia.

Blom, D.J., Koren, M.J., Roth, E., Monsalvo, M.L., Djedjos, C.S., Nelson, P., Elliott, M., Wasserman, S.M., Ballantyne, C.M., and Holman, R.R. (2017). Evaluation of the efficacy, safety and glycaemic effects of evolocumab (AMG 145) in hypercholesterolaemic patients stratified by glycaemic status and metabolic syndrome. Diabetes Obes Metab *19*, 98–107.

Borén, J., and Williams, K.J. (2016). The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. Curr. Opin. Lipidol. *27*, 473–483.

Borén, J., Olin, K., Lee, I., Chait, A., Wight, T.N., and Innerarity, T.L. (1998). Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. J. Clin. Invest. *101*, 2658–2664.

Brewer, H.B. (1981). Current concepts of the molecular structure and metabolism of human apolipoproteins and lipoproteins. Klin. Wochenschr. *59*, 1023–1035.

Brouwers, M.C.G.J., Troutt, J.S., van Greevenbroek, M.M.J., Ferreira, I., Feskens, E.J., van der Kallen, C.J.H., Schaper, N.C., Schalkwijk, C.G., Konrad, R.J., and Stehouwer, C.D.A. (2011). Plasma proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is not altered in subjects with impaired glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus, but its relationship with non-HDL cholesterol and apolipoprotein B may be modified by type 2 diabetes mellitus: The CODAM study. Atherosclerosis *217*, 263–267.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1974). Expression of the Familial Hypercholesterolemia Gene in Heterozygotes: Mechanism for a Dominant Disorder in Man. Science *185*, 61–63.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. Cell *89*, 331–340.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2009). Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. J. Lipid Res. *50*, S15–S27.

Brown, M.S., Dana, S.E., and Goldstein, J.L. (1973). Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *70*, 2162–2166.

Brown, M.S., Dana, S.E., and Goldstein, J.L. (1974). 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. *249*, 789–796.

Brown, M.S., Faust, J.R., Goldstein, J.L., Kaneko, I., and Endo, A. (1978). Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. J. Biol. Chem. *253*, 1121–1128.

Brunham, L.R., Kruit, J.K., Pape, T.D., Timmins, J.M., Reuwer, A.Q., Vasanji, Z., Marsh, B.J., Rodrigues, B., Johnson, J.D., Parks, J.S., et al. (2007). Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. Nat. Med. *13*, 340–347.

Bucher, N.L., Overath, P., and Lynen, F. (1960). beta-Hydroxy-beta-methyl-glutaryl coenzyme A reductase, cleavage and condensing enzymes in relation to cholesterol formation in rat liver. Biochim. Biophys. Acta *40*, 491–501.

Burnett, J.R., Shan, J., Miskie, B.A., Whitfield, A.J., Yuan, J., Tran, K., McKnight, C.J., Hegele, R.A., and Yao, Z. (2003). A novel nontruncating APOB gene mutation, R463W, causes familial hypobetalipoproteinemia. J. Biol. Chem. *278*, 13442–13452.

Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. Diabetes *52*, 102–110.

Cameron, J., Holla, Ø.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.

Cannon, C.P., Braunwald, E., McCabe, C.H., Rader, D.J., Rouleau, J.L., Belder, R., Joyal, S.V., Hill, K.A., Pfeffer, M.A., Skene, A.M., et al. (2004). Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. N. Engl. J. Med. *350*, 1495–1504.

Cannon, C.P., Blazing, M.A., Giugliano, R.P., McCagg, A., White, J.A., Theroux, P., Darius, H., Lewis, B.S., Ophuis, T.O., Jukema, J.W., et al. (2015). Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. New England Journal of Medicine *372*, 2387–2397.

Cao, Y.-X., Liu, H.-H., Dong, Q.-T., Li, S., and Li, J.-J. (2018). Effect of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) monoclonal antibodies on new-onset diabetes mellitus and glucose metabolism: A systematic review and meta-analysis. Diabetes Obes Metab *20*, 1391–1398.

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.

Cariou, B., Le Bras, M., Langhi, C., Le May, C., Guyomarc'h-Delasalle, B., Krempf, M., and Costet, P. (2010). Association between plasma PCSK9 and gamma-glutamyl transferase levels in diabetic patients. Atherosclerosis *211*, 700–702.

de Carvalho, L.S.F., Campos, A.M., and Sposito, A.C. (2018). Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Inhibitors and Incident Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis With Over 96,000 Patient-Years. Diabetes Care *41*, 364–367.

Castriota, F., Rieswijk, L., Dahlberg, S., La Merrill, M.A., Steinmaus, C., Smith, M.T., and Wang, J.-C. (2020). A State-of-the-Science Review of Arsenic's Effects on Glucose Homeostasis in Experimental Models. Environ Health Perspect *128*.

Castro, G.R., and Fielding, C.J. (1988). Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. Biochemistry *27*, 25–29.

Chan, D.C., Pang, J., McQuillan, B.M., Hung, J., Beilby, J.P., Barrett, P.H.R., and Watts, G.F. (2016). Plasma Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 as a Predictor of Carotid Atherosclerosis in Asymptomatic Adults. Heart Lung Circ *25*, 520–525.

Chan, J.C.Y., Piper, D.E., Cao, Q., Liu, D., King, C., Wang, W., Tang, J., Liu, Q., Higbee, J., Xia, Z., et al. (2009). 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.

Chapman, M.J., Stock, J.K., and Ginsberg, H.N. (2015). PCSK9 inhibitors and cardiovascular disease: heralding a new therapeutic era. Curr Opin Lipidol *26*, 511–520.

Chaudhury, A., Duvoor, C., Reddy Dendi, V.S., Kraleti, S., Chada, A., Ravilla, R., Marco, A., Shekhawat, N.S., Montales, M.T., Kuriakose, K., et al. (2017). Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. Front Endocrinol (Lausanne) *8*.

Chen, C., Cohrs, C.M., Stertmann, J., Bozsak, R., and Speier, S. (2017). Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. Mol Metab *6*, 943–957.

Chen, L., Magliano, D.J., and Zimmet, P.Z. (2012). The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. Nature Reviews Endocrinology *8*, 228–236.

Chen Yung-Chih, Huang Alex L., Kyaw Tin S., Bobik Alex, and Peter Karlheinz (2016). Atherosclerotic Plaque Rupture. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *36*, e63–e72.

Choe, E.Y., Cho, Y., Choi, Y., Yun, Y., Wang, H.J., Kwon, O., Lee, B.-W., Ahn, C.W., Cha, B.S., Lee, H.C., et al. (2014). The Effect of DPP-4 Inhibitors on Metabolic Parameters in Patients with Type 2 Diabetes. Diabetes & Metabolism Journal *38*, 211.

ClinVar, ncbi. nih. gov/clinvar (2019). ldlr[gene] - ClinVar - NCBI.

Cohen, J., Pertsemlidis, A., Kotowski, I.K., Graham, R., Garcia, C.K., and Hobbs, H.H. (2005). Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. Nat. Genet. *37*, 161–165.

Cohen, J.C., Boerwinkle, E., Mosley, T.H., and Hobbs, H.H. (2006). Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. N. Engl. J. Med. *354*, 1264–1272.

Colhoun, H.M., Ginsberg, H.N., Robinson, J.G., Leiter, L.A., Müller-Wieland, D., Henry, R.R., Cariou, B., Baccara-Dinet, M.T., Pordy, R., Merlet, L., et al. (2016). No effect of PCSK9 inhibitor alirocumab on the incidence of diabetes in a pooled analysis from 10 ODYSSEY Phase 3 studies. Eur. Heart J. *37*, 2981–2989.

Cosentino, F., Grant, P.J., Aboyans, V., Bailey, C.J., Ceriello, A., Delgado, V., Federici, M., Filippatos, G., Grobbee, D.E., Hansen, T.B., et al. (2020). 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASDThe Task Force for diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Eur Heart J *41*, 255–323.

Costet, P., Cariou, B., Lambert, G., Lalanne, F., Lardeux, B., Jarnoux, A.-L., Grefhorst, A., Staels, B., and Krempf, M. (2006). Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. J. Biol. Chem. *281*, 6211–6218.

Crandall, J.P., Mather, K., Rajpathak, S.N., Goldberg, R.B., Watson, K., Foo, S., Ratner, R., Barrett-Connor, E., and Temprosa, M. (2017). Statin use and risk of developing diabetes: results from the Diabetes Prevention Program. BMJ Open Diabetes Research and Care *5*, e000438.

Cui, Q., Ju, X., Yang, T., Zhang, M., Tang, W., Chen, Q., Hu, Y., Haas, J.V., Troutt, J.S., Pickard, R.T., et al. (2010). Serum PCSK9 is associated with multiple metabolic factors in a large Han Chinese population. Atherosclerosis *213*, 632–636.

Da Dalt, L., Ruscica, M., Bonacina, F., Balzarotti, G., Dhyani, A., Di Cairano, E., Baragetti, A., Arnaboldi, L., De Metrio, S., Pellegatta, F., et al. (2018). PCSK9 deficiency reduces insulin

secretion and promotes glucose intolerance: the role of the low-density lipoprotein receptor. Eur. Heart J.

Da Silva Xavier, G. (2018). The Cells of the Islets of Langerhans. J Clin Med *7*.

Dadu, R.T., and Ballantyne, C.M. (2014). Lipid lowering with PCSK9 inhibitors. Nature Reviews Cardiology *11*, 563–575.

Daniels, T.F., Killinger, K.M., Michal, J.J., Wright Jr., R.W., and Jiang, Z. (2009). Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. Int J Biol Sci *5*, 474–488.

Davies, M.J., D'Alessio, D.A., Fradkin, J., Kernan, W.N., Mathieu, C., Mingrone, G., Rossing, P., Tsapas, A., Wexler, D.J., and Buse, J.B. (2018). Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Diabetes Care *41*, 2669–2701.

Defesche, J.C., Stefanutti, C., Langslet, G., Hopkins, P.N., Seiz, W., Baccara-Dinet, M.T., Hamon, S.C., Banerjee, P., and Kastelein, J.J.P. (2017). Efficacy of alirocumab in 1191 patients with a wide spectrum of mutations in genes causative for familial hypercholesterolemia. J Clin Lipidol *11*, 1338-1346.e7.

Deng, S., Vatamaniuk, M., Huang, X., Doliba, N., Lian, M.-M., Frank, A., Velidedeoglu, E., Desai, N.M., Koeberlein, B., Wolf, B., et al. (2004). Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. Diabetes *53*, 624–632.

Dias, C.S., Shaywitz, A.J., Wasserman, S.M., Smith, B.P., Gao, B., Stolman, D.S., Crispino, C.P., Smirnakis, K.V., Emery, M.G., Colbert, A., et al. (2012). Effects of AMG 145 on low-density lipoprotein cholesterol levels: results from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose phase 1 studies in healthy volunteers and hypercholesterolemic subjects on statins. J. Am. Coll. Cardiol. *60*, 1888–1898.

DiGruccio, M.R., Mawla, A.M., Donaldson, C.J., Noguchi, G.M., Vaughan, J., Cowing-Zitron, C., van der Meulen, T., and Huising, M.O. (2016). Comprehensive alpha, beta and delta cell transcriptomes reveal that ghrelin selectively activates delta cells and promotes somatostatin release from pancreatic islets. Molecular Metabolism *5*, 449–458.

Dominiczak, M.H., and Caslake, M.J. (2011). Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. Ann. Clin. Biochem. *48*, 498–515.

Donath, M.Y., Ehses, J.A., Maedler, K., Schumann, D.M., Ellingsgaard, H., Eppler, E., and Reinecke, M. (2005). Mechanisms of β-Cell Death in Type 2 Diabetes. Diabetes *54*, S108–S113.

Dong, B., Wu, M., Li, H., Kraemer, F.B., Adeli, K., Seidah, N.G., Park, S.W., and Liu, J. (2010). Strong induction of PCSK9 gene expression through HNF1alpha and SREBP2: mechanism for the resistance to LDL-cholesterol lowering effect of statins in dyslipidemic hamsters. J. Lipid Res. *51*, 1486–1495.

Doran, A.C., Meller, N., and McNamara, C.A. (2008). Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *28*, 812–819.

Dron, J.S., and Hegele, R.A. (2017). Complexity of mechanisms among human proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 variants. Curr. Opin. Lipidol. *28*, 161–169.

Drucker, D.J., and Nauck, M.A. (2006). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. Lancet *368*, 1696–1705.

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.

Dubuc, G., Tremblay, M., Paré, G., Jacques, H., Hamelin, J., Benjannet, S., Boulet, L., Genest, J., Bernier, L., Seidah, N.G., et al. (2010). A new method for measurement of total plasma PCSK9: clinical applications. J. Lipid Res. *51*, 140–149.

Duff, C.J., Scott, M.J., Kirby, I.T., Hutchinson, S.E., Martin, S.L., and Hooper, N.M. (2009). Antibody-mediated disruption of the interaction between PCSK9 and the low-density lipoprotein receptor. Biochem. J. *419*, 577–584.

El-Mir, M.-Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M., and Leverve, X. (2000). Dimethylbiguanide Inhibits Cell Respiration via an Indirect Effect Targeted on the Respiratory Chain Complex I. J. Biol. Chem. *275*, 223–228.

ENDO, A. (2010). A historical perspective on the discovery of statins. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci *86*, 484–493.

Endo, A., Kuroda, M., and Tanzawa, K. (1976). Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. FEBS Lett. *72*, 323–326.

European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation, Reiner, Z., Catapano, A.L., De Backer, G., Graham, I., Taskinen, M.-R., Wiklund, O., Agewall, S., Alegria, E., Chapman, M.J., et al. (2011). ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). Eur. Heart J. *32*, 1769–1818.

Falk, E. (2006). Pathogenesis of Atherosclerosis. Journal of the American College of Cardiology *47*, C7–C12.

Fédération Internationale du Diabète (2019). Atlas du diabète de la FID, 9e édition, Bruxelles, Belgique.

Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In Endotext, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.

Ference, B.A., Robinson, J.G., Brook, R.D., Catapano, A.L., Chapman, M.J., Neff, D.R., Voros, S., Giugliano, R.P., Davey Smith, G., Fazio, S., et al. (2016). Variation in PCSK9 and HMGCR and Risk of Cardiovascular Disease and Diabetes. N. Engl. J. Med. *375*, 2144–2153.

Ference, B.A., Ginsberg, H.N., Graham, I., Ray, K.K., Packard, C.J., Bruckert, E., Hegele, R.A., Krauss, R.M., Raal, F.J., Schunkert, H., et al. (2017). Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Eur Heart J *38*, 2459–2472.

Ferrannini, E., Natali, A., Bell, P., Cavallo-Perin, P., Lalic, N., and Mingrone, G. (1997). Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). J. Clin. Invest. *100*, 1166–1173.

Fielding, C.J., Shore, V.G., and Fielding, P.E. (1972). A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. Biochem. Biophys. Res. Commun. *46*, 1493–1498.

Finn, A.V., Nakano, M., Narula, J., Kolodgie, F.D., and Virmani, R. (2010). Concept of vulnerable/unstable plaque. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *30*, 1282–1292.

Fisher, T.S., Surdo, P.L., Pandit, S., Mattu, M., Santoro, J.C., Wisniewski, D., Cummings, R.T., Calzetta, A., Cubbon, R.M., Fischer, P.A., et al. (2007). Effects of pH and Low Density

Lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL Receptor Regulation. J. Biol. Chem. *282*, 20502–20512.

Fitzgerald, K., White, S., Borodovsky, A., Bettencourt, B.R., Strahs, A., Clausen, V., Wijngaard, P., Horton, J.D., Taubel, J., Brooks, A., et al. (2017). A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9. N. Engl. J. Med. *376*, 41–51.

Folkers, K., Langsjoen, P., Willis, R., Richardson, P., Xia, L.J., Ye, C.Q., and Tamagawa, H. (1990). Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans. PNAS *87*, 8931–8934.

Foufelle, F., Hegarty, B.D., Bobard, A., Hainault, I., Bossard, P., and Ferré, P. (2005). A new role for insulin in the control of energetic metabolism in liver. p.

Frank-Kamenetsky, M., Grefhorst, A., Anderson, N.N., Racie, T.S., Bramlage, B., Akinc, A., Butler, D., Charisse, K., Dorkin, R., Fan, Y., et al. (2008). Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *105*, 11915–11920.

Fu, Y., Luo, N., Klein, R.L., and Garvey, W.T. (2005). Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. J. Lipid Res. *46*, 1369–1379.

Fu, Z., Gilbert, E.R., and Liu, D. (2013). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. Curr Diabetes Rev *9*, 25–53.

Galabova, G., Brunner, S., Winsauer, G., Juno, C., Wanko, B., Mairhofer, A., Lührs, P., Schneeberger, A., Bonin, A. von, Mattner, F., et al. (2014). Peptide-Based Anti-PCSK9 Vaccines - An Approach for Long-Term LDLc Management. PLOS ONE *9*, e114469.

Garcia, C.K., Wilund, K., Arca, M., Zuliani, G., Fellin, R., Maioli, M., Calandra, S., Bertolini, S., Cossu, F., Grishin, N., et al. (2001). Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. Science *292*, 1394–1398.

Gatta, B. (2008). Mécanismes moléculaires de l'insulinorésistance. /data/revues/00034266/00630001/60/.

Gauthier, M.-S., Awan, Z., Bouchard, A., Champagne, J., Tessier, S., Faubert, D., Chabot, K., Garneau, P.Y., Rabasa-Lhoret, R., Seidah, N.G., et al. (2018). Posttranslational modification of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 is differentially regulated in response to distinct cardiometabolic treatments as revealed by targeted proteomics. J Clin Lipidol *12*, 1027–1038.

Geng Yong-Jian, and Libby Peter (2002). Progression of Atheroma. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *22*, 1370–1380.

Gibbons, G.F., Islam, K., and Pease, R.J. (2000). Mobilisation of triacylglycerol stores. Biochim. Biophys. Acta *1483*, 37–57.

Gilon, P., Shepherd, R.M., and Henquin, J.C. (1993). Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca2+ as evidences in single pancreatic islets. J. Biol. Chem. *268*, 22265–22268.

Gimbrone, M.A. (1999). Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. Am. J. Pathol. *155*, 1–5.

Ginsberg, H.N. (1994). Lipoprotein metabolism and its relationship to atherosclerosis. Med. Clin. North Am. *78*, 1–20.

Gisterå, A., and Hansson, G.K. (2017). The immunology of atherosclerosis. Nature Reviews Nephrology *13*, 368–380.

Giugliano, R.P., Mach, F., Zavitz, K., Kurtz, C., Schneider, J., Wang, H., Keech, A., Pedersen, T.R., Sabatine, M.S., Sever, P.S., et al. (2017). Design and rationale of the EBBINGHAUS trial: A phase 3, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to assess the effect of evolocumab on cognitive function in patients with clinically evident cardiovascular disease and

receiving statin background lipid-lowering therapy-A cognitive study of patients enrolled in the FOURIER trial. Clin Cardiol *40*, 59–65.

Goldberg, I.J. (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. J. Lipid Res. *37*, 693–707.

Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1973). Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *70*, 2804–2808.

Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. Nature *343*, 425–430.

Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2009). History of Discovery: The LDL Receptor. Arterioscler Thromb Vasc Biol *29*, 431–438.

Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2015). A Century of Cholesterol and Coronaries: From Plaques to Genes to Statins. Cell *161*, 161–172.

Gordon, D.A., Wetterau, J.R., and Gregg, R.E. (1995). Microsomal triglyceride transfer protein: a protein complex required for the assembly of lipoprotein particles. Trends Cell Biol. *5*, 317–321.

Gotto, A.M., Pownall, H.J., and Havel, R.J. (1986). Introduction to the plasma lipoproteins. Meth. Enzymol. *128*, 3–41.

Gould, R.G., Taylor, C.B., Hagerman, J.S., Warner, I., and Campbell, D.J. (1953). Cholesterol Metabolism I. Effect of Dietary Cholesterol on the Synthesis of Cholesterol in Dog Tissue in Vitro. J. Biol. Chem. *201*, 519–528.

Graham, M.J., Lemonidis, K.M., Whipple, C.P., Subramaniam, A., Monia, B.P., Crooke, S.T., and Crooke, R.M. (2007). Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. J. Lipid Res. *48*, 763–767.

Gupta, N., Fisker, N., Asselin, M.-C., Lindholm, M., Rosenbohm, C., Ørum, H., Elmén, J., Seidah, N.G., and Straarup, E.M. (2010). A Locked Nucleic Acid Antisense Oligonucleotide (LNA) Silences PCSK9 and Enhances LDLR Expression In Vitro and In Vivo. PLoS One *5*.

Gustafsen, C., Olsen, D., Vilstrup, J., Lund, S., Reinhardt, A., Wellner, N., Larsen, T., Andersen, C.B.F., Weyer, K., Li, J., et al. (2017). Heparan sulfate proteoglycans present PCSK9 to the LDL receptor. Nature Communications *8*, 1–14.

Gylling, H., and Miettinen, T.A. (1995). The effect of cholesterol absorption inhibition on low density lipoprotein cholesterol level. Atherosclerosis *117*, 305–308.

Hanefeld, M., Brunetti, P., Schernthaner, G.H., Matthews, D.R., and Charbonnel, B.H. (2004). One-Year Glycemic Control With a Sulfonylurea Plus Pioglitazone Versus a Sulfonylurea Plus Metformin in Patients With Type 2 Diabetes. Diabetes Care *27*, 141–147.

Hao, M., Head, W.S., Gunawardana, S.C., Hasty, A.H., and Piston, D.W. (2007). Direct effect of cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic beta-cell dysfunction. Diabetes *56*, 2328–2338.

Havel, R.J., Kane, J.P., and Kashyap, M.L. (1973). Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man. J. Clin. Invest. *52*, 32–38.

Head, T., Daunert, S., and Goldschmidt-Clermont, P.J. (2017). The Aging Risk and Atherosclerosis: A Fresh Look at Arterial Homeostasis. Front Genet *8*.

Hebbachi, A.M., and Gibbons, G.F. (2001). Microsomal membrane-associated apoB is the direct precursor of secreted VLDL in primary cultures of rat hepatocytes. J. Lipid Res. *42*, 1609–1617.

Hedin, U., Bottger, B.A., Luthman, J., Johansson, S., and Thyberg, J. (1989). A substrate of the cell-attachment sequence of fibronectin (Arg-Gly-Asp-Ser) is sufficient to promote transition of arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. Dev. Biol. *133*, 489–501.

Hinnen, D. (2017). Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonists for Type 2 Diabetes. Diabetes Spectrum *30*, 202–210.

Hirst, J.A., Farmer, A.J., Dyar, A., Lung, T.W.C., and Stevens, R.J. (2013). Estimating the effect of sulfonylurea on HbA1c in diabetes: a systematic review and meta-analysis. Diabetologia *56*, 973–984.

Hobbs, H.H., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1992). Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. Human Mutation *1*, 445–466.

Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest *109*, 1125–1131.

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.

Hovingh, G.K., Davidson, M.H., Kastelein, J.J.P., and O'Connor, A.M. (2013). Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolaemia. Eur. Heart J. *34*, 962–971.

Hsia, D.S., Grove, O., and Cefalu, W.T. (2017). An Update on SGLT2 Inhibitors for the Treatment of Diabetes Mellitus. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes *24*, 73–79.

Htike, Z.Z., Zaccardi, F., Papamargaritis, D., Webb, D.R., Khunti, K., and Davies, M.J. (2017). Efficacy and safety of glucagon-like peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetes: A systematic review and mixed-treatment comparison analysis. Diabetes Obes Metab *19*, 524–536.

https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01975376 The Evaluation of Bococizumab (PF-04950615;RN316) in Reducing the Occurrence of Major Cardiovascular Events in High Risk Subjects - Full Text View - ClinicalTrials.gov.

https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01975389 The Evaluation of Bococizumab (PF-04950615; RN316) in Reducing the Occurrence of Major Cardiovascular Events in High Risk Subjects - Full Text View - ClinicalTrials.gov.

https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02508896 Study Assessing Safety, Immunogenicity and LDLc -Lowering Activity of 2 PCSK9 Targeting AFFITOPE Vaccines in Healthy Subjects - Full Text View - ClinicalTrials.gov.

https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03847974 Open-Label Extension to Evaluate the Longer Term Efficacy and Safety of LIB003 - Full Text View - ClinicalTrials.gov.

https://www.accessdata.fda.gov/ Praluent Alirocumab.

https://www.accessdata.fda.gov/ Repatha (evolocumab) injection.

Hu, F.B., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C.G., and Willett, W.C. (2001). Diet, Lifestyle, and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Women. New England Journal of Medicine *345*, 790–797.

Hui, D.Y., and Howles, P.N. (2005). Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. Semin. Cell Dev. Biol. *16*, 183–192.

Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 125–138.

Insull, W. (2009). The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. Am. J. Med. *122*, S3–S14.

Investigators, T.S.P. by A.R. in C.L. (SPARCL) (2009). High-Dose Atorvastatin after Stroke or Transient Ischemic Attack.

Ionescu-Tirgoviste, C., Gagniuc, P.A., Gubceac, E., Mardare, L., Popescu, I., Dima, S., and Militaru, M. (2015). A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. Sci Rep *5*.

Iqbal, Z., Dhage, S., Mohamad, J.B., Abdel-Razik, A., Donn, R., Malik, R., Ho, J.H., Liu, Y., Adam, S., Isa, B., et al. (2019). Efficacy and safety of PCSK9 monoclonal antibodies. Expert Opin Drug Saf *18*, 1191–1201.

Ishikawa, M., Iwasaki, Y., Yatoh, S., Kato, T., Kumadaki, S., Inoue, N., Yamamoto, T., Matsuzaka, T., Nakagawa, Y., Yahagi, N., et al. (2008). Cholesterol accumulation and diabetes in pancreatic β-cell-specific SREBP-2 transgenic mice: a new model for lipotoxicity. J. Lipid Res. *49*, 2524–2534.

Jang, H.-D., Lee, S.E., Yang, J., Lee, H.-C., Shin, D., Lee, H., Lee, J., Jin, S., Kim, S., Lee, S.J., et al. (2020). Cyclase-associated protein 1 is a binding partner of proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 and is required for the degradation of low-density lipoprotein receptors by proprotein convertase subtilisin/kexin type-9. Eur Heart J *41*, 239–252.

Jansen, E., Ayoubi, T.A.Y., Meulemans, S.M.P., and Ven, W.J.M.V. de (1995). Neuroendocrine-specific Expression of the Human Prohormone Convertase 1 Gene HORMONAL REGULATION OF TRANSCRIPTION THROUGH DISTINCT cAMP RESPONSE ELEMENTS. J. Biol. Chem. *270*, 15391–15397.

Jeong, H.J., Lee, H.-S., Kim, K.-S., Kim, Y.-K., Yoon, D., and Park, S.W. (2008). Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. J. Lipid Res. *49*, 399–409.

Jones, P., Kafonek, S., Laurora, I., and Hunninghake, D. (1998). Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). Am. J. Cardiol. *81*, 582–587.

Jukema J. Wouter, Zijlstra Laurien E., Bhatt Deepak L., Bittner Vera A., Diaz Rafael, Drexel Heinz, Goodman Shaun G., Kim Yong-Un, Pordy Robert, Reiner Željko, et al. (2019). Effect of Alirocumab on Stroke in ODYSSEY OUTCOMES. Circulation *140*, 2054–2062.

Kaneko, I., Hazama-Shimada, Y., and Endo, A. (1978). Inhibitory effects on lipid metabolism in cultured cells of ML-236B, a potent inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase. Eur. J. Biochem. *87*, 313–321.

Kappelle, P.J.W.H., Lambert, G., Dahlbäck, B., Nielsen, L.B., and Dullaart, R.P.F. (2011). Relationship of plasma apolipoprotein M with proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 levels in non-diabetic subjects. Atherosclerosis *214*, 492–494.

Kastelein, J.J.P., Hovingh, G.K., Langslet, G., Baccara-Dinet, M.T., Gipe, D.A., Chaudhari, U., Zhao, J., Minini, P., and Farnier, M. (2017). Efficacy and safety of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 monoclonal antibody alirocumab vs placebo in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. J Clin Lipidol *11*, 195-203.e4.

Khan Safi U., Rahman Hammad, Okunrintemi Victor, Riaz Haris, Khan Muhammad Shahzeb, Sattur Sudhakar, Kaluski Edo, Lincoff A. Michael, Martin Seth S., and Blaha Michael J. (2019). Association of Lowering Low-Density Lipoprotein Cholesterol With Contemporary Lipid-Lowering Therapies and Risk of Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of the American Heart Association *8*, e011581.

Knowler, W.C., Barrett-Connor, E., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Lachin, J.M., Walker, E.A., Nathan, D.M., and Diabetes Prevention Program Research Group (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. N. Engl. J. Med. *346*, 393–403.

Ko Min Jung, Jo Ae Jeong, Kim Yun Jung, Kang Shin Hee, Cho Songhee, Jo Sang-Ho, Park Cheol-Young, Yun Sung-Cheol, Lee Woo Je, and Park Duk-Woo (2019). Time- and Dose-Dependent Association of Statin Use With Risk of Clinically Relevant New-Onset Diabetes Mellitus in Primary Prevention: A Nationwide Observational Cohort Study. Journal of the American Heart Association *8*, e011320.

Kobayashi, K., Oka, K., Forte, T., Ishida, B., Teng, B., Ishimura-Oka, K., Nakamuta, M., and Chan, L. (1996). Reversal of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice by adenovirus-mediated gene transfer of the very low density lipoprotein receptor. J. Biol. Chem. *271*, 6852–6860.

Koh, K.K., Quon, M.J., Sakuma, I., Lee, Y., Lim, S., Han, S.H., and Shin, E.K. (2011). Effects of simvastatin therapy on circulating adipocytokines in patients with hypercholesterolemia. Int. J. Cardiol. *146*, 434–437.

Koppen, L.M., Whitaker, A., Rosene, A., and Beckett, R.D. (2017). Efficacy of Berberine Alone and in Combination for the Treatment of Hyperlipidemia: A Systematic Review. J Evid Based Complementary Altern Med *22*, 956–968.

Kruit, J.K., Brunham, L.R., Verchere, C.B., and Hayden, M.R. (2010a). HDL and LDL cholesterol significantly influence beta-cell function in type 2 diabetes mellitus. Curr. Opin. Lipidol. *21*, 178–185.

Kruit, J.K., Kremer, P.H.C., Dai, L., Tang, R., Ruddle, P., de Haan, W., Brunham, L.R., Verchere, C.B., and Hayden, M.R. (2010b). Cholesterol efflux via ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and cholesterol uptake via the LDL receptor influences cholesterol-induced impairment of beta cell function in mice. Diabetologia *53*, 1110–1119.

Kruit, J.K., Wijesekara, N., Fox, J.E.M., Dai, X.-Q., Brunham, L.R., Searle, G.J., Morgan, G.P., Costin, A.J., Tang, R., Bhattacharjee, A., et al. (2011). Islet cholesterol accumulation due to loss of ABCA1 leads to impaired exocytosis of insulin granules. Diabetes *60*, 3186–3196.

Kwakernaak, A.J., Lambert, G., and Dullaart, R.P.F. (2012). Relationship of proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 levels with resistin in lean and obese subjects. Clinical Biochemistry *45*, 1522–1524.

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.

Lafont, A. (2003). Basic aspects of plaque vulnerability. Heart *89*, 1262–1267.

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.

Lakoski, S.G., Lagace, T.A., Cohen, J.C., Horton, J.D., and Hobbs, H.H. (2009). Genetic and Metabolic Determinants of Plasma PCSK9 Levels. J Clin Endocrinol Metab *94*, 2537–2543.

Lalanne, F., Lambert, G., Amar, M.J.A., Chétiveaux, M., Zaïr, Y., Jarnoux, A.-L., Ouguerram, K., Friburg, J., Seidah, N.G., Brewer, H.B., et al. (2005). Wild-type PCSK9 inhibits LDL clearance but does not affect apoB-containing lipoprotein production in mouse and cultured cells. J. Lipid Res. *46*, 1312–1319.

Lambert, G. (2007). Unravelling the functional significance of PCSK9. Curr. Opin. Lipidol. *18*, 304–309.

Lambert, G., Ancellin, N., Charlton, F., Comas, D., Pilot, J., Keech, A., Patel, S., Sullivan, D.R., Cohn, J.S., Rye, K.-A., et al. (2008). Plasma PCSK9 concentrations correlate with LDL and total cholesterol in diabetic patients and are decreased by fenofibrate treatment. Clin. Chem. *54*, 1038–1045.

Lambert, G., Sjouke, B., Choque, B., Kastelein, J.J.P., and Hovingh, G.K. (2012). The PCSK9 decade. J. Lipid Res. *53*, 2515–2524.

Lambert, G., Petrides, F., Chatelais, M., Blom, D.J., Choque, B., Tabet, F., Wong, G., Rye, K.-A., Hooper, A.J., Burnett, J.R., et al. (2014). Elevated plasma PCSK9 level is equally detrimental for patients with nonfamilial hypercholesterolemia and heterozygous familial hypercholesterolemia, irrespective of low-density lipoprotein receptor defects. J. Am. Coll. Cardiol. *63*, 2365–2373.

Landlinger, C., Pouwer, M.G., Juno, C., van der Hoorn, J.W.A., Pieterman, E.J., Jukema, J.W., Staffler, G., Princen, H.M.G., and Galabova, G. (2017). The AT04A vaccine against proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces total cholesterol, vascular inflammation, and atherosclerosis in APOE*3Leiden.CETP mice. Eur Heart J *38*, 2499–2507.

Langhi, C., Le May, C., Gmyr, V., Vandewalle, B., Kerr-Conte, J., Krempf, M., Pattou, F., Costet, P., and Cariou, B. (2009). PCSK9 is expressed in pancreatic delta-cells and does not alter insulin secretion. Biochem. Biophys. Res. Commun. *390*, 1288–1293.

Lapchak, P.A. (2002). Hemorrhagic transformation following ischemic stroke: Significance, causes, and relationship to therapy and treatment. Curr Neurol Neurosci Rep *2*, 38–43.

Lavecchia, A., and Cerchia, C. (2019). Recent advances in developing PCSK9 inhibitors for lipid-lowering therapy. Future Med Chem *11*, 423–441.

Lee, C.J., Lee, Y.-H., Park, S.W., Kim, K.J., Park, S., Youn, J.-C., Lee, S.-H., Kang, S.-M., and Jang, Y. (2013). Association of serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 with carotid intima media thickness in hypertensive subjects. Metab. Clin. Exp. *62*, 845–850.

Leigh, S., Futema, M., Whittall, R., Taylor-Beadling, A., Williams, M., den Dunnen, J.T., and Humphries, S.E. (2017). The UCL low-density lipoprotein receptor gene variant database: pathogenicity update. J. Med. Genet. *54*, 217–223.

Li, H., Dong, B., Park, S.W., Lee, H.-S., Chen, W., and Liu, J. (2009). Hepatocyte nuclear factor 1alpha plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine. J. Biol. Chem. *284*, 28885–28895.

Li, J., Tumanut, C., Gavigan, J.-A., Huang, W.-J., Hampton, E.N., Tumanut, R., Suen, K.F., Trauger, J.W., Spraggon, G., Lesley, S.A., et al. (2007). Secreted PCSK9 promotes LDL receptor degradation independently of proteolytic activity. Biochem. J. *406*, 203–207.

Liang, H., Chaparro-Riggers, J., Strop, P., Geng, T., Sutton, J.E., Tsai, D., Bai, L., Abdiche, Y., Dilley, J., Yu, J., et al. (2012). Proprotein Convertase Substilisin/Kexin Type 9 Antagonism Reduces Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Statin-Treated Hypercholesterolemic Nonhuman Primates. J Pharmacol Exp Ther *340*, 228–236.

Lindholm, M.W., Elmén, J., Fisker, N., Hansen, H.F., Persson, R., Møller, M.R., Rosenbohm, C., Ørum, H., Straarup, E.M., and Koch, T. (2012). PCSK9 LNA Antisense Oligonucleotides

Induce Sustained Reduction of LDL Cholesterol in Nonhuman Primates. Mol Ther *20*, 376–381.

Linton, M.F., Yancey, P.G., Davies, S.S., Jerome, W.G., Linton, E.F., Song, W.L., Doran, A.C., and Vickers, K.C. (2000). The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. In Endotext, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.

Lotta, L.A., Sharp, S.J., Burgess, S., Perry, J.R.B., Stewart, I.D., Willems, S.M., Luan, J., Ardanaz, E., Arriola, L., Balkau, B., et al. (2016). Association Between Low-Density Lipoprotein Cholesterol-Lowering Genetic Variants and Risk of Type 2 Diabetes: A Meta-analysis. JAMA *316*, 1383–1391.

Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. Nature *407*, 233–241.

Ma, P.T., Gil, G., Südhof, T.C., Bilheimer, D.W., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1986). Mevinolin, an inhibitor of cholesterol synthesis, induces mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of hamsters and rabbits. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *83*, 8370–8374.

Mach, F., Baigent, C., Catapano, A.L., Koskinas, K.C., Casula, M., Badimon, L., Chapman, M.J., De Backer, G.G., Delgado, V., Ference, B.A., et al. (2019). 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular riskThe Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). Eur Heart J.

Madiraju, A.K., Erion, D.M., Rahimi, Y., Zhang, X.-M., Braddock, D.T., Albright, R.A., Prigaro, B.J., Wood, J.L., Bhanot, S., MacDonald, M.J., et al. (2014). Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. Nature *510*, 542–546.

Marais, A.D. (2004). Familial Hypercholesterolaemia. Clin Biochem Rev *25*, 49–68.

Marchetti, P., Bugliani, M., De Tata, V., Suleiman, M., and Marselli, L. (2017). Pancreatic Beta Cell Identity in Humans and the Role of Type 2 Diabetes. Front Cell Dev Biol *5*.

Martinez, L.O., Georgeaud, V., Rolland, C., Collet, X., Tercé, F., Perret, B., and Barbaras, R. (2000). Characterization of two high-density lipoprotein binding sites on porcine hepatocyte plasma membranes: contribution of scavenger receptor class B type I (SR-BI) to the low-affinity component. Biochemistry *39*, 1076–1082.

Mason, D.P., Kenagy, R.D., Hasenstab, D., Bowen-Pope, D.F., Seifert, R.A., Coats, S., Hawkins, S.M., and Clowes, A.W. (1999). Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery. Circ. Res. *85*, 1179–1185.

Maxwell, K.N., and Breslow, J.L. (2004). Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 7100–7105.

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.

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.

Mayne, J., Raymond, A., Chaplin, A., Cousins, M., Kaefer, N., Gyamera-Acheampong, C., Seidah, N.G., Mbikay, M., Chrétien, 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.

Mbikay, M., Sirois, F., Mayne, J., Wang, G.-S., Chen, A., Dewpura, T., Prat, A., Seidah, N.G., Chretien, M., and Scott, F.W. (2010). PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities. FEBS Lett. *584*, 701–706.

McKenney, J.M., Koren, M.J., Kereiakes, D.J., Hanotin, C., Ferrand, A.-C., and Stein, E.A. (2012). Safety and efficacy of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease, SAR236553/REGN727, in patients with primary hypercholesterolemia receiving ongoing stable atorvastatin therapy. J. Am. Coll. Cardiol. *59*, 2344–2353.

McNutt, M.C., Lagace, T.A., and Horton, J.D. (2007). Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. J. Biol. Chem. *282*, 20799–20803.

Meigs, J.B., Cupples, L.A., and Wilson, P.W. (2000). Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. Diabetes *49*, 2201–2207.

Miao, J., Manthena, P.V., Haas, M.E., Ling, A.V., Shin, D.-J., Graham, M.J., Crooke, R.M., Liu, J., and Biddinger, S.B. (2015). Role of Insulin in the Regulation of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *35*, 1589–1596.

Miller, R.A., Chu, Q., Xie, J., Foretz, M., Viollet, B., and Birnbaum, M.J. (2013). Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. Nature *494*, 256–260.

Mitchell, T., Chao, G., Sitkoff, D., Lo, F., Monshizadegan, H., Meyers, D., Low, S., Russo, K., DiBella, R., Denhez, F., et al. (2014). Pharmacologic Profile of the Adnectin BMS-962476, a Small Protein Biologic Alternative to PCSK9 Antibodies for Low-Density Lipoprotein Lowering. J Pharmacol Exp Ther *350*, 412–424.

Morrone, D., Weintraub, W.S., Toth, P.P., Hanson, M.E., Lowe, R.S., Lin, J., Shah, A.K., and Tershakovec, A.M. (2012). Lipid-altering efficacy of ezetimibe plus statin and statin monotherapy and identification of factors associated with treatment response: a pooled analysis of over 21,000 subjects from 27 clinical trials. Atherosclerosis *223*, 251–261.

Mozaffarian, D., Benjamin, E.J., Go, A.S., Arnett, D.K., Blaha, M.J., Cushman, M., de Ferranti, S., Després, J.-P., Fullerton, H.J., Howard, V.J., et al. (2015). Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. Circulation *131*, e29-322.

Murphy, A.J., Macdonald, L.E., Stevens, S., Karow, M., Dore, A.T., Pobursky, K., Huang, T.T., Poueymirou, W.T., Esau, L., Meola, M., et al. (2014). Mice with megabase humanization of their immunoglobulin genes generate antibodies as efficiently as normal mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *111*, 5153–5158.

Mytilinaiou, M., Kyrou, I., Khan, M., Grammatopoulos, D.K., and Randeva, H.S. (2018). Familial Hypercholesterolemia: New Horizons for Diagnosis and Effective Management. Front Pharmacol *9*.

Nakata, M., Nagasaka, S., Kusaka, I., Matsuoka, H., Ishibashi, S., and Yada, T. (2006). Effects of statins on the adipocyte maturation and expression of glucose transporter 4 (SLC2A4): implications in glycaemic control. Diabetologia *49*, 1881–1892.

Naoumova Rossi P., Tosi Isabella, Patel Dilip, Neuwirth Clare, Horswell Stuart D., Marais A. David, van Heyningen Charles, and Soutar Anne K. (2005). Severe Hypercholesterolemia in Four British Families With the D374Y Mutation in the PCSK9 Gene. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *25*, 2654–2660.

Napoli, C., D'Armiento, F.P., Mancini, F.P., Postiglione, A., Witztum, J.L., Palumbo, G., and Palinski, W. (1997). Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its

oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. J. Clin. Invest. *100*, 2680–2690.

Ndiaye, F.K., Ortalli, A., Canouil, M., Huyvaert, M., Salazar-Cardozo, C., Lecoeur, C., Verbanck, M., Pawlowski, V., Boutry, R., Durand, E., et al. (2017). Expression and functional assessment of candidate type 2 diabetes susceptibility genes identify four new genes contributing to human insulin secretion. Mol Metab *6*, 459–470.

Noguchi, T., Kobayashi, J., Yagi, K., Nohara, A., Yamaaki, N., Sugihara, M., Ito, N., Oka, R., Kawashiri, M.-A., Tada, H., et al. (2011). Comparison of effects of bezafibrate and fenofibrate on circulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and adipocytokine levels in dyslipidemic subjects with impaired glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus: results from a crossover study. Atherosclerosis *217*, 165–170.

Nordestgaard, B.G., Chapman, M.J., Humphries, S.E., Ginsberg, H.N., Masana, L., Descamps, O.S., Wiklund, O., Hegele, R.A., Raal, F.J., Defesche, J.C., et al. (2013). Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. Eur. Heart J. *34*, 3478–3490a.

Nozue, T. (2017). Lipid Lowering Therapy and Circulating PCSK9 Concentration. J Atheroscler Thromb *24*, 895–907.

Odom, D.T., Zizlsperger, N., Gordon, D.B., Bell, G.W., Rinaldi, N.J., Murray, H.L., Volkert, T.L., Schreiber, J., Rolfe, P.A., Gifford, D.K., et al. (2004). Control of Pancreas and Liver Gene Expression by HNF Transcription Factors. Science *303*, 1378–1381.

Organization, W.H. (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus.

Ose, L. (2002). [Müller-Harbitz disease--familial hypercholesterolemia]. Tidsskr. Nor. Laegeforen. *122*, 924–925.

Pahwa, R., and Jialal, I. (2019). Atherosclerosis. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

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.

Paseban, M., Butler, A.E., and Sahebkar, A. (2019). Mechanisms of statin-induced new-onset diabetes. Journal of Cellular Physiology *234*, 12551–12561.

Pattnaik, N.M., Montes, A., Hughes, L.B., and Zilversmit, D.B. (1978). Cholesteryl ester exchange protein in human plasma isolation and characterization. Biochim. Biophys. Acta *530*, 428–438.

Pessin, J.E., and Saltiel, A.R. (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. J Clin Invest *106*, 165–169.

Phan, B.A.P., Dayspring, T.D., and Toth, P.P. (2012). Ezetimibe therapy: mechanism of action and clinical update. Vasc Health Risk Manag *8*, 415–427.

Piera-Mardemootoo, C., Lambert, P., and Faillie, J.-L. (2018). Efficacy of metformin on glycemic control and weight in drug-naive type 2 diabetes mellitus patients: A systematic review and meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. Therapie.

van Poelgeest, E.P., Hodges, M.R., Moerland, M., Tessier, Y., Levin, A.A., Persson, R., Lindholm, M.W., Dumong Erichsen, K., Ørum, H., Cohen, A.F., et al. (2015). Antisense-mediated reduction of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): a first-in-human randomized, placebo-controlled trial. Br J Clin Pharmacol *80*, 1350–1361.

Poirier, S., and Mayer, G. (2013). The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: new and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol. Drug Des Devel Ther *7*, 1135–1148.

Poirier, S., Mamarbachi, M., Chen, W.-T., Lee, A.S., and Mayer, G. (2015). GRP94 Regulates Circulating Cholesterol Levels through Blockade of PCSK9-Induced LDLR Degradation. Cell Rep *13*, 2064–2071.

Proks, P., Reimann, F., Green, N., Gribble, F., and Ashcroft, F. (2002). Sulfonylurea Stimulation of Insulin Secretion. Diabetes *51*, S368–S376.

Rader, D.J., and Hobbs, H.H. (2016). Disorders of Lipoprotein Metabolism.

Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R.M., Sempoux, C., and Henquin, J.C. (2008). Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab *10 Suppl 4*, 32–42.

Ramin-Mangata, S., Blanchard, V., and Lambert, G. (2018). Key aspects of PCSK9 inhibition beyond LDL lowering. Curr. Opin. Lipidol. *29*, 453–458.

Ramin-Mangata, S., Wargny, M., Pichelin, M., May, C.L., Thédrez, A., Blanchard, V., Nativel, B., Santos, R.D., Benseñor, I.M., Lotufo, P.A., et al. (2020). Circulating PCSK9 levels are not associated with the conversion to type 2 diabetes. Atherosclerosis *293*, 49–56.

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. PNAS *102*, 5374–5379.

Ravassard, P., Hazhouz, Y., Pechberty, S., Bricout-Neveu, E., Armanet, M., Czernichow, P., and Scharfmann, R. (2011). A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. J. Clin. Invest. *121*, 3589–3597.

Rawshani, A., Rawshani, A., Franzén, S., Eliasson, B., Svensson, A.-M., Miftaraj, M., McGuire, D.K., Sattar, N., Rosengren, A., and Gudbjörnsdottir, S. (2017). Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes. New England Journal of Medicine *376*, 1407–1418.

Ray, K.K., Stoekenbroek, R.M., Kallend, D., Nishikido, T., Leiter, L.A., Landmesser, U., Wright, R.S., Wijngaard, P.L.J., and Kastelein, J.J.P. (2019a). Effect of 1 or 2 Doses of Inclisiran on Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels: One-Year Follow-up of the ORION-1 Randomized Clinical Trial. JAMA Cardiol *4*, 1067–1075.

Ray, K.K., Colhoun, H.M., Szarek, M., Baccara-Dinet, M., Bhatt, D.L., Bittner, V.A., Budaj, A.J., Diaz, R., Goodman, S.G., Hanotin, C., et al. (2019b). Effects of alirocumab on cardiovascular and metabolic outcomes after acute coronary syndrome in patients with or without diabetes: a prespecified analysis of the ODYSSEY OUTCOMES randomised controlled trial. The Lancet Diabetes & Endocrinology *7*, 618–628.

Ridker, P.M., Pradhan, A., MacFadyen, J.G., Libby, P., and Glynn, R.J. (2012). Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: an analysis from the JUPITER trial. The Lancet *380*, 565–571.

Ridker, P.M., Revkin, J., Amarenco, P., Brunell, R., Curto, M., Civeira, F., Flather, M., Glynn, R.J., Gregoire, J., Jukema, J.W., et al. (2017). Cardiovascular Efficacy and Safety of Bococizumab in High-Risk Patients.

Robinson, J.G., Farnier, M., Krempf, M., Bergeron, J., Luc, G., Averna, M., Stroes, E.S., Langslet, G., Raal, F.J., El Shahawy, M., et al. (2015). Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. N. Engl. J. Med. *372*, 1489–1499.

Röder, P.V., Wu, B., Liu, Y., and Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. Exp Mol Med *48*, e219.

Roehrich, M.-E., Mooser, V., Lenain, V., Herz, J., Nimpf, J., Azhar, S., Bideau, M., Capponi, A., Nicod, P., Haefliger, J.-A., et al. (2003). Insulin-secreting beta-cell dysfunction induced by human lipoproteins. J. Biol. Chem. *278*, 18368–18375.

Rorsman, P., and Ashcroft, F.M. (2018). Pancreatic β-Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. Physiol Rev *98*, 117–214.

Rorsman, P., and Renström, E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. Diabetologia *46*, 1029–1045.

Rosenblum, S.B., Huynh, T., Afonso, A., Davis, H.R., Yumibe, N., Clader, J.W., and Burnett, D.A. (1998). Discovery of 1-(4-fluorophenyl)-(3R)-[3-(4-fluorophenyl)-(3S)-hydroxypropyl]-(4S)-(4 -hydroxyphenyl)-2-azetidinone (SCH 58235): a designed, potent, orally active inhibitor of cholesterol absorption. J. Med. Chem. *41*, 973–980.

Rosenson, R.S., and Tangney, C.C. (1998). Antiatherothrombotic Properties of Statins: Implications for Cardiovascular Event Reduction. JAMA *279*, 1643–1650.

Rosenson, R.S., Hegele, R.A., Fazio, S., and Cannon, C.P. (2018). The Evolving Future of PCSK9 Inhibitors. Journal of the American College of Cardiology *72*, 314–329.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. N. Engl. J. Med. *340*, 115–126.

Roth, E.M. (2019). Alirocumab for low-density lipoprotein cholesterol lowering. Future Cardiol *15*, 17–29.

Roth, E.M., McKenney, J.M., Hanotin, C., Asset, G., and Stein, E.A. (2012). Atorvastatin with or without an Antibody to PCSK9 in Primary Hypercholesterolemia. New England Journal of Medicine *367*, 1891–1900.

Rütti, S., Ehses, J.A., Sibler, R.A., Prazak, R., Rohrer, L., Georgopoulos, S., Meier, D.T., Niclauss, N., Berney, T., Donath, M.Y., et al. (2009). Low- and high-density lipoproteins

modulate function, apoptosis, and proliferation of primary human and murine pancreatic beta-cells. Endocrinology *150*, 4521–4530.

Sabatine, M.S., Giugliano, R.P., Keech, A.C., Honarpour, N., Wiviott, S.D., Murphy, S.A., Kuder, J.F., Wang, H., Liu, T., Wasserman, S.M., et al. (2017a). Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. N. Engl. J. Med. *376*, 1713–1722.

Sabatine, M.S., Leiter, L.A., Wiviott, S.D., Giugliano, R.P., Deedwania, P., De Ferrari, G.M., Murphy, S.A., Kuder, J.F., Gouni-Berthold, I., Lewis, B.S., et al. (2017b). Cardiovascular safety and efficacy of the PCSK9 inhibitor evolocumab in patients with and without diabetes and the effect of evolocumab on glycaemia and risk of new-onset diabetes: a prespecified analysis of the FOURIER randomised controlled trial. Lancet Diabetes Endocrinol *5*, 941–950.

Sabatine, M.S., Leiter, L.A., Wiviott, S.D., Giugliano, R.P., Deedwania, P., De Ferrari, G.M., Murphy, S.A., Kuder, J.F., Gouni-Berthold, I., Lewis, B.S., et al. (2017c). Cardiovascular safety and efficacy of the PCSK9 inhibitor evolocumab in patients with and without diabetes and the effect of evolocumab on glycaemia and risk of new-onset diabetes: a prespecified analysis of the FOURIER randomised controlled trial. Lancet Diabetes Endocrinol *5*, 941–950.

Sabesin, S.M., and Frase, S. (1977). Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine. J. Lipid Res. *18*, 496–511.

Sahebkar, A., Simental-Mendía, L.E., Guerrero-Romero, F., Golledge, J., and Watts, G.F. (2015). Effect of statin therapy on plasma proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) concentrations: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. Diabetes Obes Metab *17*, 1042–1055.

Sattar, N., Toth, P.P., Blom, D.J., Koren, M.J., Soran, H., Uhart, M., Elliott, M., Cyrille, M., Somaratne, R., and Preiss, D. (2017). Effect of the Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type

9 Inhibitor Evolocumab on Glycemia, Body Weight, and New-Onset Diabetes Mellitus. Am. J. Cardiol. *120*, 1521–1527.

Schmidt, A.F., Swerdlow, D.I., Holmes, M.V., Patel, R.S., Fairhurst-Hunter, Z., Lyall, D.M., Hartwig, F.P., Horta, B.L., Hyppönen, E., Power, C., et al. (2017). PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a mendelian randomisation study. Lancet Diabetes Endocrinol *5*, 97–105.

Schmidt, A.F., Holmes, M.V., Preiss, D., Swerdlow, D.I., Denaxas, S., Fatemifar, G., Faraway, R., Finan, C., Valentine, D., Fairhurst-Hunter, Z., et al. (2019). Phenome-wide association analysis of LDL-cholesterol lowering genetic variants in PCSK9. BMC Cardiovascular Disorders *19*, 240.

Schreiber, S.A., Ferlinz, K., and Haak, T. (2008). The Long-Term Efficacy of Insulin Glargine Plus Oral Antidiabetic Agents in a 32-Month Observational Study of Everyday Clinical Practice. Diabetes Technology & Therapeutics *10*, 121–127.

Schroeder, C.I., Swedberg, J.E., Withka, J.M., Rosengren, K.J., Akcan, M., Clayton, D.J., Daly, N.L., Cheneval, O., Borzilleri, K.A., Griffor, M., et al. (2014). Design and Synthesis of Truncated EGF-A Peptides that Restore LDL-R Recycling in the Presence of PCSK9 In Vitro. Chemistry & Biology *21*, 284–294.

Schwartz, G.G., Steg, P.G., Szarek, M., Bhatt, D.L., Bittner, V.A., Diaz, R., Edelberg, J.M., Goodman, S.G., Hanotin, C., Harrington, R.A., et al. (2018). Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. New England Journal of Medicine *379*, 2097–2107.

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.

Shan, L., Pang, L., Zhang, R., Murgolo, N.J., Lan, H., and Hedrick, J.A. (2008). PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. Biochemical and Biophysical Research Communications *375*, 69–73.

Shapiro, M.D., Tavori, H., and Fazio, S. (2018). PCSK9: From Basic Science Discoveries to Clinical Trials. Circ Res *122*, 1420–1438.

Shaw, R.J., Lamia, K.A., Vasquez, D., Koo, S.-H., Bardeesy, N., DePinho, R.A., Montminy, M., and Cantley, L.C. (2005). The Kinase LKB1 Mediates Glucose Homeostasis in Liver and Therapeutic Effects of Metformin. Science *310*, 1642–1646.

Silver, B., Ramaiya, K., Andrew, S.B., Fredrick, O., Bajaj, S., Kalra, S., Charlotte, B.M., Claudine, K., and Makhoba, A. (2018). EADSG Guidelines: Insulin Therapy in Diabetes. Diabetes Ther *9*, 449–492.

Silverman, M.G., Ference, B.A., Im, K., Wiviott, S.D., Giugliano, R.P., Grundy, S.M., Braunwald, E., and Sabatine, M.S. (2016). Association Between Lowering LDL-C and Cardiovascular Risk Reduction Among Different Therapeutic Interventions: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA *316*, 1289–1297.

Sizar, O., Khare, S., and Talati, R. (2020). Statin Medications. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Skyler, J.S., Bakris, G.L., Bonifacio, E., Darsow, T., Eckel, R.H., Groop, L., Groop, P.-H., Handelsman, Y., Insel, R.A., Mathieu, C., et al. (2017). Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. Diabetes *66*, 241–255.

Sniderman, A.D., Tsimikas, S., and Fazio, S. (2014). The Severe Hypercholesterolemia Phenotype: Clinical Diagnosis, Management, and Emerging Therapies. Journal of the American College of Cardiology *63*, 1935–1947.

Sodhi, N., and Brown, D.L. (2019). 7 - Pathophysiology of Acute Coronary Syndromes: Plaque Rupture and Atherothrombosis. In Cardiac Intensive Care (Third Edition), D.L. Brown, ed. (Philadelphia: Content Repository Only!), pp. 68-80.e2.

Song, R. (2016). Mechanism of Metformin: A Tale of Two Sites. Diabetes Care *39*, 187–189.

Stein, D.T., Devaraj, S., Balis, D., Adams-Huet, B., and Jialal, I. (2001). Effect of statin therapy on remnant lipoprotein cholesterol levels in patients with combined hyperlipidemia. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *21*, 2026–2031.

Stein, E.A., Mellis, S., Yancopoulos, G.D., Stahl, N., Logan, D., Smith, W.B., Lisbon, E., Gutierrez, M., Webb, C., Wu, R., et al. (2012). Effect of a Monoclonal Antibody to PCSK9 on LDL Cholesterol. New England Journal of Medicine *366*, 1108–1118.

Stein, E.A., Kasichayanula, S., Turner, T., Kranz, T., Arumugam, U., Biernat, L., and Lee, J. (2019). Ldl Cholesterol Reduction with Bms-962476, an Adnectin Inhibitor of Pcsk9: Results of a Single Ascending Dose Study. J Am Coll Cardiol *63*, A1372.

Steiner, D.J., Kim, A., Miller, K., and Hara, M. (2010). Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. Islets *2*, 135–145.

Taki, A., Kermani, A., Ranjbarnavazi, S.M., and Pourmodheji, A. (2017). Chapter 4 - Overview of Different Medical Imaging Techniques for the Identification of Coronary Atherosclerotic Plaques. In Computing and Visualization for Intravascular Imaging and Computer-Assisted Stenting, S. Balocco, M.A. Zuluaga, G. Zahnd, S.-L. Lee, and S. Demirci, eds. (Academic Press), pp. 79–106.

Talathi, S.S., and Young, M. (2020). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Pancreas. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Thornberry, N.A., and Gallwitz, B. (2009). Mechanism of action of inhibitors of dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4). Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism *23*, 479–486.

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.

Toth, P.P., Patti, A.M., Giglio, R.V., Nikolic, D., Castellino, G., Rizzo, M., and Banach, M. (2018a). Management of Statin Intolerance in 2018: Still More Questions Than Answers. Am J Cardiovasc Drugs *18*, 157–173.

Toth, P.P., Sattar, N., Blom, D.J., Martin, S.S., Jones, S.R., Monsalvo, M.L., Elliott, M., Davis, M., Somaratne, R., and Preiss, D. (2018b). Effect of Evolocumab on Lipoprotein Particles. American Journal of Cardiology *121*, 308–314.

Tsimikas, S., Gordts, P.L.S.M., Nora, C., Yeang, C., and Witztum, J.L. (2019). Statin therapy increases lipoprotein(a) levels. Eur. Heart J.

Valenti, V., Noto, D., Giammanco, A., Fayer, F., Spina, R., Altieri, G.I., Ingrassia, V., Scrimali, C., Barbagallo, C.M., Brucato, F., et al. (2020). PCSK9-D374Y mediated LDL-R degradation can be functionally inhibited by EGF-A and truncated EGF-A peptides: An in vitro study. Atherosclerosis *292*, 209–214.

Varret, M., and Rabès, J.-P. (2012). Missense Mutation in the LDLR Gene: A Wide Spectrum in the Severity of Familial Hypercholesterolemia. Mutations in Human Genetic Disease.

Varret, M., Rabès, J.P., Saint-Jore, B., Cenarro, A., Marinoni, J.C., Civeira, F., Devillers, M., Krempf, M., Coulon, M., Thiart, R., et al. (1999). A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32. Am. J. Hum. Genet. *64*, 1378–1387.

Vega-Monroy, M.-L.L. de la, and Fernandez-Mejia, C. (2011). Beta-Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes. Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy.

Viollet, B., Guigas, B., Garcia, N.S., Leclerc, J., Foretz, M., and Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. Clinical Science (London, England : 1979) *122*, 253.

Virmani, R., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Farb, A., and Schwartz, S.M. (2000). Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *20*, 1262–1275.

Wang, K.-L., Liu, C.-J., Chao, T.-F., Huang, C.-M., Wu, C.-H., Chen, S.-J., Chen, T.-J., Lin, S.-J., and Chiang, C.-E. (2012). Statins, risk of diabetes, and implications on outcomes in the general population. J. Am. Coll. Cardiol. *60*, 1231–1238.

Wang, N., Silver, D.L., Costet, P., and Tall, A.R. (2000). Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. J. Biol. Chem. *275*, 33053–33058.

Weir, G.C., and Bonner-Weir, S. (2011). Finally! A human pancreatic β cell line. J. Clin. Invest. *121*, 3395–3397.

Welder, G., Zineh, I., Pacanowski, M.A., Troutt, J.S., Cao, G., and Konrad, R.J. (2010). High-dose atorvastatin causes a rapid sustained increase in human serum PCSK9 and disrupts its correlation with LDL cholesterol. J. Lipid Res. *51*, 2714–2721.

Werner, C., Hoffmann, M.M., Winkler, K., Böhm, M., and Laufs, U. (2014). Risk prediction with proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in patients with stable coronary disease on statin treatment. Vascul. Pharmacol. *62*, 94–102.

WHO (2015). Cardiovascular diseases (CVDs).

Wilcox, G. (2005). Insulin and Insulin Resistance. Clin Biochem Rev *26*, 19–39.

World Health Organization (2011). Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus: Abbreviated Report of a WHO Consultation (Geneva: World Health Organization).

Xia, F., Xie, L., Mihic, A., Gao, X., Chen, Y., Gaisano, H.Y., and Tsushima, R.G. (2008). Inhibition of cholesterol biosynthesis impairs insulin secretion and voltage-gated calcium channel function in pancreatic beta-cells. Endocrinology *149*, 5136–5145.

Yada, T., Nakata, M., Shiraishi, T., and Kakei, M. (2009). Inhibition by simvastatin, but not pravastatin, of glucose-induced cytosolic Ca2+ signalling and insulin secretion due to blockade of L-type Ca2+ channels in rat islet β-cells. British Journal of Pharmacology *126*, 1205–1213.

Yamamoto, A., Sudo, H., and Endo, A. (1980). Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia. Atherosclerosis *35*, 259–266.

Yoon, K.H., Ko, S.H., Cho, J.H., Lee, J.M., Ahn, Y.B., Song, K.H., Yoo, S.J., Kang, M.I., Cha, B.Y., Lee, K.W., et al. (2003). Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. J. Clin. Endocrinol. Metab. *88*, 2300–2308.

Yusuf, S., Hawken, S., Ôunpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., et al. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. The Lancet *364*, 937–952.

Zaccardi, F., Webb, D.R., Htike, Z.Z., Youssef, D., Khunti, K., and Davies, M.J. (2016). Efficacy and safety of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors in type 2 diabetes mellitus: systematic review and network meta-analysis. Diabetes Obes Metab *18*, 783–794.

Zaid, A., Roubtsova, A., Essalmani, R., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Hamelin, J., Tremblay, M., Jacques, H., Jin, W., Davignon, J., et al. (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.

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

Zhang, D.-W., Lagace, T.A., Garuti, R., Zhao, Z., McDonald, M., Horton, J.D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2007). 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. *282*, 18602–18612.

Zhang, L., Reue, K., Fong, L.G., Young, S.G., and Tontonoz, P. (2012a). Feedback regulation of cholesterol uptake by the LXR-IDOL-LDLR axis. Arterioscler Thromb Vasc Biol *32*, 2541–2546.

Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A., and Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. Science *258*, 468–471.

Zhang, Y., Zhou, L., Kong-Beltran, M., Li, W., Moran, P., Wang, J., Quan, C., Tom, J., Kolumam, G., Elliott, J.M., et al. (2012b). Calcium-Independent Inhibition of PCSK9 by Affinity-Improved Variants of the LDL Receptor EGF(A) Domain. Journal of Molecular Biology *422*, 685–696.

Ziemke, F., and Mantzoros, C.S. (2010). Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research1234. Am J Clin Nutr *91*, 258S-261S.

van der Zijl, N.J., Goossens, G.H., Moors, C.C.M., van Raalte, D.H., Muskiet, M.H.A., Pouwels, P.J.W., Blaak, E.E., and Diamant, M. (2011). Ectopic fat storage in the pancreas, liver, and abdominal fat depots: impact on β-cell function in individuals with impaired glucose metabolism. J. Clin. Endocrinol. Metab. *96*, 459–467.