

Article paru dans « Le Papyrus », mensuel d'informations sur la science et la technologie :  
N°23 de juillet 2016

Email: [le.papyrus2014@gmail.com](mailto:le.papyrus2014@gmail.com)

Site: [www.lepapyrusrdc.com](http://www.lepapyrusrdc.com)

Tel: 0818108796

## Méandres et bifurcations de la recherche scientifique :

Témoignage d'un chercheur chevronné

**Majambu Mbikay, Pharm. B., M.A., Ph.D.** *Ottawa Health Research Institute, University of Ottawa et L'Institut de recherches cliniques de Montréal*

### L'épopée des convertases

Quand, en septembre 1983, j'ai rejoint, à titre de chercheur senior et de professeur, l'Institut de recherches cliniques de Montréal (l'IRCM) et l'unité de recherche en neuroendocrinologie moléculaire dirigée par le professeur Michel Chrétien, j'arrivais au terme de deux quinquennats de formation en recherche : le premier d'études doctorales sur la régulation moléculaire de la biosynthèse des hémoglobines, menées à la State University of New York at Buffalo, aux États-Unis ; le second d'études postdoctorales sur la génétique de la résistance cellulaire aux métaux toxiques, menées à l'Université de Sherbrooke, au Québec. Comme sujet de recherche à l'institut, le facteur natriurétique atrial (*Atrial Natriuretic Factor*, ANF) avait le vent en poupe. Cette hormone relâchée par le cœur était censée révolutionner le traitement de l'hypertension. Les essais cliniques ont déçu ; ils n'ont pas donné les résultats escomptés.

Mon premier sujet de recherche à l'IRCM portait sur un sujet moins flamboyant que l'ANF, une protéine énigmatique, du nom cryptique de 7B2, qui avait été isolée de l'hypophyse humaine deux ans auparavant dans l'unité du professeur Chrétien. Elle ressemblait à une hormone, mais du fait qu'elle se retrouvait dans toutes les cellules neuronales et endocriniennes, un rôle plus général dans le fonctionnement de ces cellules était plus probable. Ce rôle, avons-nous pensé, serait de remplir les vésicules de sécrétion de leurs cargaisons propres d'hormones ou de neuropeptides qui ne seront relâchés dans les espaces extracellulaires que sur stimulus physiologique. Mon défi était de caractériser comment la 7B2 était produite du gène à l'ARN messenger à la protéine. Il m'a pris quatre ans pour le relever.

Au début des années 90, une équipe hollandaise a proposé que cette mystérieuse protéine était la compagne d'une protéase nommée Convertase de Proprotéines -2 (*Proprotein Convertase 2*, PC2) que notre équipe venait de découvrir. La 7B2 accompagne la PC2 dans la voie sécrétoire de la cellule, l'empêchant d'agir jusqu'à ce qu'elle atteigne le

bon endroit. [1]. Soudain, la 7B2 était à la une de la recherche. Elle tirait son importance de son association avec la famille des PCs, ces enzymes qui 'convertissent' les protéines inactives en protéines actives en les coupant à des endroits précis.

La recherche et la découverte des PCs sont une saga en elles-mêmes. Elle a commencé en 1967, bien avant mon temps (je terminais à peine ma première candidature en sciences à l'Université Lovanium de Kinshasa). Un jeune médecin canadien français du nom de Michel Chrétien, stagiaire dans un laboratoire de chimie des peptides en Californie, ayant élucidé la séquence en acides aminés d'un peptide hypophysaire, avait remarqué que ce peptide était un fragment d'un autre peptide plus long déjà connu, et que ces deux peptides contenaient au sein de leurs séquences celle d'une hormone très puissante, la mélatropine bêta, l'hormone de la noirceur épidermique et de la satiété. Il avait alors énoncé la théorie selon laquelle un précurseur polypeptidique peu actif (prohormone) peut donner lieu à un ou plusieurs peptides actifs (hormones) à la suite de coupures par des enzymes spécifiques [2]. Sa théorie a été validée avec le temps par moult évidences expérimentales.

De cette théorie, Professeur Chrétien a prédit l'existence des PCs ; il s'est attelé à réunir les talents et les équipements qui lui permettraient de les identifier. À son unité de chimie des protéines se sont successivement joints plusieurs professeurs/chercheurs d'origines ethnoculturelles diverses : Nabil G. Seidah l'Égyptien en 1974, Claude Lazure le Québécois en 1982, moi le Congolo-Zaïrois en 1983, Mycieslaw Marcinkiewicz le Polonais en 1985 et Ajoy Basak l'Indien en 1987. Une mosaïque que seul un pays tel le Canada peut assembler. Une école était née. "Convertis aux convertases et héritiers idéologiques d'un chrétien" (sic !), nous avions chacun notre expertise propre à contribuer dans la chasse à ces enzymes élusives. Le mien était dans la biologie moléculaire et la génétique. Douloreusement, la chasse par les méthodes biochimiques s'est avéré maintes fois non-fructueuse. Le cul-de-sac a été percé par une révolution technologique en biologie moléculaire, l'invention de la *polymerase chain reaction* (PCR), une technique qui permet d'amplifier à la chaîne des traces d'ADN. En appliquant cette technique et en exploitant les analogies avec des enzymes de la levure, nous avons pu repêcher l'ADN de celles des mammifères. Ce grand moment d'eurêka est survenu en 1990, 7 ans après mon arrivée à l'IRCM et 23 ans après la formulation de la théorie des prohormones par le professeur Chrétien. Nous nous attendions à une PC ; nous en avons deux d'un coup, PC1 et PC2 ; sept autres allaient bientôt suivre [3].

Au cours de la décade 90, les PCs nous ont gardés occupés, préoccupés, excités et enchantés, professeurs, stagiaires, étudiants et techniciens même. La découverte des PCs nous a sortis de domaine restreint de l'endocrinologie pour nous amener à explorer ceux de la fertilité, du développement, de l'obésité, du diabète, du cancer, des maladies cardio-vasculaires, neurologiques et infectieuses. Car ces enzymes interviennent dans presque tous les aspects de la physiologie [4]. Génétique humaine, transgénèse animale, biologie cellulaire et moléculaire, chimie et biochimie, toute l'armada des techniques de pointe a été mise à contribution pour établir et comprendre l'importance de ces enzymes

dans la santé et la maladie. Toutefois, la thérapie à base des PCs, comme agents ou cibles, demeuraient une possibilité encore lointaine [5].

## L'envolée de la PCSK9

Puis la PCSK9 est venue. Cette benjamine des PCs, découverte en 2003, allait changer la donne. Elle m'a trouvé au Loeb Institut d'Ottawa, plus tard rebaptisée Ottawa Hospital Research Institute (OHRI), où professeur Chrétien et moi avons déménagé nos activités de recherche. La PCSK9 est une enzyme transitoire ; elle se mue en protéine-escorte qui s'attache aux récepteurs des lipoprotéines à faible densité (*low-density lipoprotein*, LDL). Les LDLs transportent le cholestérol (-C) dans le sang pour redistribution aux parties du corps ; ses récepteurs, les LDLRs, situés à la surface des cellules du foie, capturent les LDL-Cs et les évacuent dans cet organe ; là, le cholestérol est converti en bile et déversé dans les intestins. Ce mécanisme sert à diminuer le taux de cholestérol sanguin. La PCSK9 s'oppose à cette diminution : elle détruit les LDLRs et régule donc le cholestérol à la hausse [6]. Une activité accrue de cette protéine peut augmenter ce taux à un niveau qui peut s'avérer dangereux pour la santé cardio-vasculaire. C'était d'ailleurs l'association d'une mutation de gène *PCSK9* avec une hypercholestérolémie familiale grave qui avait permis la d'en dévoiler la fonction.

Autant les années 1990 avaient été celles des PCs en général, autant les années au-delà de 2003 jusqu'à ce jour ont été marquées par la PCSK9. Cette protéine a retenu notre attention et celle d'une grande frange des milieux biomédical et clinique. La molécule s'est avérée être un portail vers un monde de merveilles. S'il existe quelques mutations qui mènent aux maladies cardio-vasculaires, il y en a bon nombre d'autres qui protègent à divers degrés contre ces maladies. Deux mutations en particulier se retrouvent seulement chez les Américains de descendance africaine ; elles sont cardio-protectives à presque à 90%. La PCSK9 circule dans le sang ; elle était donc une cible idéale à inactiver pour traiter l'excès de cholestérol sanguin. Cela a été rapidement démontré par plusieurs méthodes, allant de la biologie cellulaire à des études précliniques chez les animaux aux essais cliniques chez l'homme. D'ores et déjà, de nombreux essais ont prouvé que l'injection d'anticorps monoclonaux humanisés contre la PCSK9 est un moyen sûr et efficace de diminuer le cholestérol sanguin en cas d'excès.

## Une hypothèse en quête d'évidence

Dès les débuts de l'histoire de la PCSK9, j'étais intrigué par la fréquence relativement élevée des mutations hypocholestérolémiantes de son gène chez les Africains-Américains. En génétique, dans la plupart des cas, une mutation s'installe dans une population quand elle protège les enfants d'une mort prématurée (leur permettant d'atteindre l'âge de la reproduction) ou quand elle confère un avantage reproductif. Selon toute vraisemblance, les maladies cardio-vasculaires sont nouvelles-venues (moins d'un siècle) dans le

panorama africain de santé publique. Par ailleurs, elles s'aggravent avec l'âge et tuent principalement les adultes, donc des personnes qui auront déjà eu la chance de se reproduire. J'ai émis l'hypothèse que ces mutations protégeaient contre les causes prépondérantes de mortalité infantile en Afrique. Ces causes, au regard de l'histoire médicale du continent, ont été les maladies infectieuses, le paludisme en particulier [7]. Une fouille attentive de la littérature scientifique m'a révélé plusieurs résultats qui semblaient supporter l'idée que le cholestérol de l'hôte favoriserait la multiplication du *Plasmodium*, le parasite responsable du paludisme.

Deux corollaires dérivait de cette hypothèse : 1) ces mutations devraient être plus fréquentes dans les régions où le paludisme est endémique ; 2) les enfants qui les portaient mourraient en moindre nombre du paludisme que les non-porteurs. Le premier corollaire a été confirmé dans une étude génétique en Afrique de l'Ouest [8] ; quant au second, il est en cours de vérification à travers une collaboration que nous menons avec des chercheurs du Mali et de la République Démocratique du Congo, grâce à une subvention de l'Institut Mérieux de France. Si ce corollaire s'avérait vrai, une intervention médicale visant à inactiver la PCSK9 permettrait d'atténuer la gravité du paludisme et d'augmenter les chances de survie des enfants affectés. Dans cette éventualité, les anticorps monoclonaux anti-PCSK9 si célébrés en Occident se prêteraient mal au combat contre le paludisme en Afrique : leur production coûte cher et leur administration est parentérale donc invasive. La thérapie idéale dans ce contexte devrait comprendre une médication à coût modique et de prise orale.

### **Du fantasme à la réalité**

Un soir de 2007, au cours d'une conversation, mon épouse Mujangi-Annie m'a remis une poudre verte qui lui venait d'une amie burundaise. La poudre, selon cette dernière, aurait des vertus thérapeutiques extraordinaires contre presque toutes les maladies chroniques. Elle était faite de feuilles séchées et pulvérisées de *Moringa oleifera*, une plante originaire de l'Inde et qui se cultive dans beaucoup de pays tropicaux. Intrigué, mais sceptique, j'ai fouillé l'Internet pour en savoir plus. J'y ai trouvé une pléthore de pages (plus de 90,000 !) sur la plante ; les vertus nutritionnelles et thérapeutiques lui attribuées étaient à mes yeux trop fantastiques pour être fondées. 'Arbre miracle', 'Arbre de la vie', 'Don de Dieu aux pauvres' ! Des appellations qui relevaient plus du culte et du fantasme que des faits, ai-je pensé. J'ai consulté la littérature scientifique à ce sujet : elle était maigre à l'embarras. J'ai décortiqué la petite centaine d'articles qu'il y avait sur la plante en rapport avec le métabolisme du glucose et du cholestérol et j'en ai fait la synthèse [9]. Sonia Simoes, une jeune Française, est alors arrivée de Paris pour un stage de fin de baccalauréat. Sans trop en attendre, je lui ai confié comme projet de vérifier les effets d'un extrait aqueux de la poudre de Moringa sur la production et la sécrétion de la PCSK9 par les cellules hépatiques en culture. Les premiers résultats sont tombés ; ils nous ont tous déboussolés : de menues

doses croissantes de l'extrait diminuaient de façon progressive la sécrétion de la PCSK9 dans le milieu de culture, de près de 80% à la dose maximale utilisée !

Ces résultats ont été corroborés dans des expériences subséquentes. Ils nous ont tant épatés que professeur Chrétien et moi, en cobayes volontaires, avons décidé de vérifier le produit sur nous-mêmes. Nous savions que celui-ci était consommé de part le monde sans danger. Nous avons néanmoins recherché un fournisseur fiable qui pouvait garantir la qualité de son produit par des analyses chimiques et microbiologiques documentées ; nous l'avons trouvé en Israël. Nous avons déterminé notre taux sanguin de PCSK9 ; puis, pendant deux mois, nous avons consommé quotidiennement 800 mg (deux capsules) de la poudre de Moringa ; enfin, nous avons retesté notre PCSK9 circulante : elle avait diminué de moitié chez le professeur Chrétien et de deux tiers chez moi ! Il ne m'en fallait pas plus. J'ai commencé aussitôt à rechercher l'ingrédient responsable de cet effet. Pour diverses raisons de précedence et d'analogie, j'ai suspecté que cet ingrédient serait la quercétine glycosylée (Q3G), le flavonoïde le plus abondant de la feuille de Moringa. Avec l'assistance de madame Francine Sirois, ma fidèle technicienne depuis 30 ans, je l'ai soumise au test : elle bloquait la sécrétion de la PCSK9 par les cellules hépatiques, augmentait les LDLRs à la surface de ces cellules et favorisait la reprise intracellulaire des LDL-Cs externes [10]. La Q3G pouvait donc servir d'agent anti-cholestérol oral. Anti-cholestérol, peut-être aussi anti-paludique. Cela, nos études précliniques en cours permettront de le vérifier.

## Le tournant EBOV

En 2012, pour des raisons familiales, professeur Chrétien et moi avons 'rapatrié' nos activités de recherches à l'IRCM tout en conservant nos affiliations au OHRI et à l'Université d'Ottawa. Nos travaux sur la Q3G allaient prendre un tournant inattendu deux ans plus tard. Le professeur Keith Walley, un chercheur de l'Université de Colombie Britannique à Vancouver, venait d'observer que les individus portant les mutations hypocholestérolémiantes de la PCSK9 survivaient mieux à la séptisémie bactérienne que les non-porteurs. Il a attribué cet effet protecteur à l'augmentation des LDLRs hépatiques. Selon lui, ces récepteurs 'nettoyaient' le sang, non seulement du cholestérol en excès, mais aussi des toxines bactériennes. Or nos résultats avec la Q3G suggéraient que le flavonoïde stimulait directement l'expression des LDLRs bien au-delà de son effet inhibiteur sur la sécrétion de la PCSK9. Professeur Chrétien a vite 'pressenti' que le produit pouvait posséder un potentiel anti-infectieux à large spectre. Contre le *Plasmodium*, et même contre le virus Ebola (EBOV) qui décimait alors des vies humaines dans plusieurs pays de l'Afrique de l'Ouest. Il a aussitôt pris contact avec Dre Xiangguo Qiu du Laboratoire National de Microbiologie (NML) à Winnipeg, le seul habilité à manipuler l'EBOV au Canada ; il l'a convaincue à tester sa présomption dans son modèle murin de la maladie. Je lui ai fourni la Q3G. Les résultats ont conforté cette présomption au delà de toute attente : une injection péritonéale du flavonoïde, 30 minutes seulement avant l'administration du virus, protégeait toutes les souris de toute morbidité ou mortalité due à l'infection. Une prophylaxie parfaite ! Notre article sur cette découverte surprenante vient de paraître [1]. À l'IRCM, nous tentons à présent d'élucider les mécanisme d'action de la Q3G tandis qu'au LNM, on s'apprête à la tester contre l'Ebola chez le singe. L'application à l'homme devra attendre encore quelque temps, mais puisque ce produit naturel est déjà accepté pour consommation humaine par les agences de réglementation de plusieurs pays, ce temps promet d'être court.

## Quoi de l'avenir ?

Des hémoglobines à la 7B2 à la Q3G à l'EBOV en passant pas les PCs et la Moringa, en voilà une croisière ! Passionante, elle aura duré 43 ans. Si le Ciel me prête vie, je naviguerai, pour quelque temps encore et de surprises en surprises, les méandres et bifurcations que m'imposera mon exploration de quelques fondements de la santé et de la maladie. Comme par le passé, je ne cheminerai pas seul, mais avec de nombreux collègues, stagiaires, étudiants et techniciens piqués comme moi par la 'mouche' de la recherche biomédicale.

## Bibliographie sélective

- [1] Mbikay M, Seidah NG, Chretien M, Neuroendocrine secretory protein 7B2: structure, expression and functions, *Biochem. J.* (2001), **357**:329-342.

- [2] Chretien M, Li CH, Isolation, purification, and characterization of gamma-lipotropic hormone from sheep pituitary glands, *Can. J. Biochem.* (1967), **45**:1163-1174.
- [3] Chretien M, My road to Damascus: how I converted to the prohormone theory and the proprotein convertases, *Biochem. Cell Biol.* (2012), **90**:750-768.
- [4] Seidah NG, Sadr MS, Chretien M, Mbikay M, The multifaceted proprotein convertases: their unique, redundant, complementary, and opposite functions, *J. Biol. Chem.* (2013), **288**:21473-21481.
- [5] Chretien M, Seidah NG, Basak A, Mbikay M, Proprotein convertases as therapeutic targets, *Expert Opinion Therapeutic Targets* (2008), **12**:1289-1300.
- [6] Mbikay M, Mayne J, Chretien M, Proprotein convertases subtilisin/kexin type 9, an enzyme turned escort protein: hepatic and extra hepatic functions, *J. Diabetes* (2013), **5**:391-405.
- [7] Mbikay M, Mayne J, Seidah NG, Chretien M, Of PCSK9, cholesterol homeostasis and parasitic infections: possible survival benefits of loss-of-function PCSK9 genetic polymorphisms, *Med. Hypotheses* (2007), **69**:1010-1017.
- [8] Sirois F, Gbeha E, Sanni A, Chretien M, Labuda D, Mbikay M, Ethnic differences in the frequency of the cardioprotective C679X PCSK9 mutation in a West African population, *Genet Test* (2008), **12**:377-380.
- [9] Mbikay M, Therapeutic Potential of Moringa oleifera Leaves in Chronic Hyperglycemia and Dyslipidemia: A Review, *Front. Pharmacol.* (2012), **3**:24.
- [10] Mbikay M, Sirois F, Simoes S, Mayne J, Chretien M, Quercetin-3-glucoside increases low-density lipoprotein receptor (LDLR) expression, attenuates proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) secretion, and stimulates LDL uptake by Huh7 human hepatocytes in culture, *FEBS Open Bio* (2014), **4**:755-762.
- [11] Qiu X, Kroeker A, He S, Kozak R, Audet J, Mbikay M, Chretien M, Prophylactic efficacy of Quercetin-3-beta-O-D-glucoside against Ebola virus infection, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2016).



**À la Société Royale de Londres (2009).** *De droite à gauche:* Professeur Michel Chrétien et son épouse Mme Micheline Ruel Chrétien, Mme Mujangi-Annie Lunganga et son époux Professeur Majambu Mbikay, Le Très Honorable Jean Chrétien, ancien Premier Ministre du Canada et grand-frère du Professeur Chrétien