

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

**L'EFFET DE L'ACTIVATION DE L'AMPK SUR LE
MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES**

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

FRANÇOIS DALLAIRE

AVRIL 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier :

Louise Brissette qui a su m'orienter tout au long de ma recherche, faire ressortir le meilleur de moi-même, respecter mes idées scientifiques et me donner la chance de travailler dans son laboratoire. Elle est pour moi une deuxième mère!

David Rhains qui est pour moi une encyclopédie d'informations scientifiques, un guide et un exemple.

Jade Desjardins qui est la meilleure collègue possible. Nos forces complémentaires faisaient de nous une équipe incroyable!

Ghizlane Gaougaou qui fut la première à m'initier dans le domaine de la recherche. Nous avons la même façon de penser, ce qui rendait le travail simple.

Denis Flipo qui est une fabuleuse ressource technique. Merci pour les belles images!

Corinne Martineau qui est un modèle exemplaire!

Louise Falstrault qui fut présente lors de mes premiers pas en recherche.

Geneviève Collin qui est une fiancée au cœur d'or, à la générosité sans limites et qui me donne envie d'être une meilleure personne.

Et mes parents, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. La science, l'école et la persévérance sont des thèmes qu'ils m'ont légués pour la vie.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|------|
| LISTE DES FIGURES | vii |
| LISTE DES TABLEAUX | ix |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | x |
| RÉSUMÉ | xiii |
| CHAPITRE I | |
| ÉTAT DES CONNAISSANCES | |
| 1.1 Maladies cardiovasculaires | 1 |
| 1.2 Lipoprotéines..... | 2 |
| 1.2.1 Les lipoprotéines de très faible densité et les chylomicrons | 3 |
| 1.2.2 Les lipoprotéines de faible densité | 4 |
| 1.2.3 Les lipoprotéines de haute densité | 5 |
| 1.3 Récepteurs de lipoprotéines..... | 7 |
| 1.3.1 Le récepteur de LDL | 7 |
| 1.3.2 Le «sterol Regulatory Element-Binding Proteins 2» | 9 |
| 1.3.3 La «proprotein convertase subtilisin/kexin type 9» | 9 |
| 1.3.4 Le récepteur «scavenger» de classe B type 1 | 11 |
| 1.3.5 La «PDZ domain containing 1» | 12 |
| 1.3.6 Le «cluster of differentiation 36» | 13 |
| 1.4. L'adenosine monophosphate-activated protein kinase..... | 13 |
| 1.4.1 La metformine | 15 |
| 1.4.2 L'AICAR..... | 16 |

| | |
|---|----|
| 1.4.3 Effet de l'activation de l'AMPK | 16 |
| 1.5 Problématique, hypothèses et objectifs de travail | 18 |

CHAPITRE II

EFFECT OF METFORMIN AND AICAR ON DETERMINANTS OF LIPOPROTEIN METABOLISM IN THE MOUSE

| | |
|--|----|
| Répartition du travail pour le premier manuscrit | 21 |
| 2.1 Summary | 22 |
| 2.2 Introduction..... | 23 |
| 2.3 Materials and methods..... | 27 |
| 2.3.1 Materials..... | 27 |
| 2.3.2 Animals and treatments..... | 27 |
| 2.3.3 Lipid and apoA-I level determinations..... | 27 |
| 2.3.4 HDL ₃ isolation and labelling..... | 28 |
| 2.3.5 Lipoprotein clearance <i>in vivo</i> | 28 |
| 2.3.6 Immunoblotting..... | 29 |
| 2.3.7 mRNA quantification by qPCR..... | 29 |
| 2.3.8 Statistic study..... | 30 |
| 2.4 Results..... | 31 |
| 2.5 Discussion..... | 34 |
| 2.6 Acknowledgements..... | 37 |
| 2.7 References..... | 38 |
| 2.8 Figure and tables legends..... | 43 |

CHAPITRE III

EFFECT OF METFORMIN AND AICAR ON DETERMINANTS OF
LIPOPROTEIN METABOLISM IN HUMAN HEPG2 HEPATOMA CELLS

| | |
|--|----|
| Répartition du travail pour le deuxième manuscrit..... | 56 |
| 3.1 Summary..... | 57 |
| 3.2 Introduction..... | 58 |
| 3.3 Experimental procedures..... | 60 |
| 3.3.1 Materials..... | 60 |
| 3.3.2 HepG2 cell culture and treatments..... | 60 |
| 3.3.3 Preparation and labelling of lipoproteins..... | 61 |
| 3.3.4 Lipoprotein cell association and degradation assays..... | 61 |
| 3.3.5 mRNA quantification..... | 62 |
| 3.3.6 Immunoblotting..... | 62 |
| 3.3.7 Lipid and apoA-I level determinations..... | 63 |
| 3.3.8 Confocal microscopy..... | 63 |
| 3.3.9 Statistic study..... | 63 |
| 3.4 Results..... | 64 |
| 3.5 Discussion..... | 67 |
| 3.6 References..... | 70 |
| 3.7 Figure and tables legends..... | 75 |

CHAPITRE IV

| | |
|-----------------|----|
| DISCUSSION..... | 90 |
|-----------------|----|

| | |
|--|-----|
| 4.1 Effet de l'AICAR et de la metformine sur l'activation de l'AMPK..... | 91 |
| 4.2 Effet de l'AMPK sur le métabolisme du cholestérol et des triglycérides.... | 92 |
| 4.3 Effet de l'AMPK sur le rLDL..... | 93 |
| 4.4 Effet de l'AMPK sur SR-BI..... | 95 |
| 4.5 Effet de l'AMPK sur la captation globale de la LDL et de la HDL dans les cellules HepG2..... | 95 |
| 4.6 Effet de l'AMPK sur la captation sélective des EC des LDL et des HDL dans les cellules HepG2..... | 96 |
| 4.7 Effet de l'activation de l'AMPK sur le profil lipidique de la souris..... | 97 |
| 4.8 Effet de l'AMPK sur la synthèse des HDL..... | 98 |
| CHAPITRE V | |
| CONCLUSION..... | 100 |
| Références bibliographiques..... | 103 |

LISTE DES FIGURES

| Figure | Page |
|--|------|
| 1.1 Structure des lipoprotéines..... | 2 |
| 1.2 Caractéristiques des différentes classes de lipoprotéines..... | 3 |
| 1.3 Structure du rLDL..... | 8 |
| 1.4 Régulation du rLDL..... | 10 |
| 1.5 Structure générale de la protéine SR-BI à la surface cellulaire..... | 11 |
| 1.6 Structure de la protéine AMPK et les différentes kinases pouvant la phosphoryler..... | 14 |
| 2.1 Protein levels of pAMPK, ACC, pACC, SREBP-1c and HMG-CoA red in the liver of control and metformin- or AICAR-treated mice | 50 |
| 2.2 Hepatic CHOL and TG levels and blood total CHOL, LDL-CHOL, HDL-CHOL and apoA-I levels of control and metformin- or AICAR-treated mice... | 51 |
| 2.3 Protein levels of SR-BI, SR-BII, apoA-I, HNF-4 α , ABCA1, LDLr, SREBP-2 and PCSK9 in the liver of control and metformin- or AICAR-treated mice..... | 52 |
| 2.4 Turnover studies of ³ H-CE- and ¹²⁵ I-HDL in control and AICAR-treated mice..... | 53 |
| 2.5 Summary of the effects of metformin and AICAR on hepatic lipid and plasma lipoprotein determinants..... | 54 |
| 3.1 Effect of metformin and AICAR on cell viability and lipoprotein receptors modulation in HepG2 cells..... | 81 |
| 3.2 Effect of metformin and AICAR on AMPKp and AMPK levels in HepG2 cells..... | 82 |

| | |
|---|----|
| 3.3 Effect of metformin and AICAR on LDLr expression in HepG2 cells..... | 83 |
| 3.4 Effect of metformin and AICAR on PCSK9 level in medium of HepG2 cells.. | 84 |
| 3.5 Effect of metformin and AICAR on SR-BI expression in HepG2 cells..... | 85 |
| 3.6 Immunofluorescence analysis of HepG2 cells expressing SR-BI on cell membrane..... | 86 |
| 3.7 Effect of metformin and AICAR on CD36 expression in HepG2 cells..... | 87 |
| 3.8 Effect of metformin and AICAR on apoA-I expression in HepG2 cells..... | 88 |
| 3.9 Effect of metformin, AICAR and MG132 on apoA-I cellular levels and secretion by HepG2 cells..... | 89 |

LISTE DES TABLEAUX

| Tableau | Page |
|---|------|
| 2.1 Forward and reverse primers for qPCR..... | 45 |
| 2.2 Protein levels of pAMPK, ACC, pACC, SREBP-1c and HMG-CoA red in the liver of control and metformin- or AICAR-treated mice..... | 46 |
| 2.3 Protein levels of LDLr, SREBP-2, PCSK9, SR-BI, SR-BII, apoA-I, HNF-4 α and ABCA1 in the liver of control and metformin- or AICAR-treated mice..... | 47 |
| 2.4 Fractional catabolic rates for ¹²⁵ I- and ³ H-CE-labelled HDL ₃ from plasma of control and AICAR-treated mice..... | 48 |
| 2.5 Hepatic LDLr, SR-BI, ABCA1, apoA-I and HNF-4 α mRNA levels in control and metformin- or AICAR-treated mice..... | 49 |
| 3.1 Forward and reverse primers for qPCR..... | 78 |
| 3.2 Effect of AICAR, metformin and compound C on HepG2 cell intracellular triglyceride and cholesterol content..... | 79 |
| 3.3 Effect of AICAR on LDL and HDL metabolism in HepG2 cells..... | 80 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|-------------|---|
| ABCA1 | «ATP-binding cassette transporter A1» |
| ABCG1 | «ATP-binding cassette transporter G1» |
| ACC | Acétyl-CoA carboxylase |
| ACAT | Acétyl-Coenzyme A acétyltransférase |
| AICAR | 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide |
| AMP | Adénosine monophosphate |
| AMPK | «Adenosine monophosphate activated protein kinase» |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| Apo | Apolipoprotéine |
| ARH | «Autosomal recessive hypercholesterolemia» |
| CAMKK | «Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase kinases» |
| CBS | Cystathionine-β-synthase |
| CD36 | «Cluster of Differentiation-36» |
| CETP | Protéine de transfert des esters de cholestérol |
| CHOL | Cholestérol |
| CL | Cholestérol libre |
| CS | Captation sélective |
| EC | Esters de cholestérol |
| GLUT4 | «Glucose transporter type 4» |
| HDL | Lipoprotéines de haute densité |
| HMG-CoA réd | 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase |

| | |
|---------------|--|
| HNF4 α | «Hepatocyte nuclear factor » 4 α |
| IDL | Lipoprotéines de densité intermédiaire |
| KO | «Knockout» |
| LCAT | Lécithine cholestérol acyl transférase |
| LDL | Lipoprotéines de faible densité |
| LDLox | Lipoprotéines de faible densité oxydées |
| LH | Lipase hépatique |
| LKB1 | « Liver kinase B1 » |
| Lp(a) | Lipoprotéine (a) |
| LPL | Lipoprotéine lipase |
| MCV | Maladies cardio-vasculaires |
| OCT1 | «Organic cation uptake transporter» |
| PCSK9 | «Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9» |
| PDZK1 | «PDZ domain containing 1 » |
| rLDL | Récepteur de LDL |
| SCAP | «SREBP cleavage-activating protein» |
| SR-BI | «Scavenger receptor class B type I» |
| SR-BII | «Scavenger receptor class B type II» |
| SREBP-1 | «Sterol regulatory element-binding protein 1» |
| SREBP-2 | «Sterol regulatory element-binding protein 2» |
| TAK1 | «Transforming growth factor beta-activated kinase 1» |
| TIC | Transport inverse du cholestérol |
| TG | Triglycérides |

VLDL

Lipoprotéines de très faible densité

RÉSUMÉ

Il est bien connu que les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la première cause de mortalité en Amérique du Nord. Ces MCV sont associées positivement avec la concentration plasmatique en cholestérol (CHOL) des lipoprotéines de faible densité (LDL) et négativement avec celle des lipoprotéines de haute densité (HDL). Le métabolisme des LDL est dicté par le récepteur de LDL (rLDL) qui les capte et mène à leur dégradation totale par une voie endosomale. Le «scavenger receptor-class B type I» (SR-BI) est un récepteur capable de métaboliser à la fois la LDL et la HDL en captant une partie de leur contenu en esters de CHOL (EC) sans entraîner leur dégradation. L'incidence de plus en plus grande d'individus souffrant de diabète de type 2 engendre une hausse de la prise de médicaments visant à augmenter l'activité de l'«AMP-activated protein kinase» (AMPK), une kinase jouant un rôle clé dans le métabolisme de la cellule. Une autre molécule pharmacologique capable d'activer l'AMPK est le 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR). Le but de notre étude est de déterminer les effets de l'activation de l'AMPK hépatique sur le métabolisme des lipoprotéines chez la souris et dans les cellules hépatomateuses humaines HepG2. Brièvement, les traitements à l'AICAR et à la metformine diminuent l'expression de SR-BI dans le foie de la souris et dans les cellules HepG2. Le rLDL reste échangé chez la souris pour les deux traitements, mais augmente dans les cellules HepG2. Cette différence semble être causée par une disparité dans la modulation de la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9), une enzyme menant à la dégradation des rLDL. La captation globale des LDL par les cellules HepG2 traitées corrèle avec l'augmentation du rLDL. Au contraire, l'augmentation de la captation sélective des EC des HDL et des LDL ne concorde pas avec la diminution du niveau total de SR-BI cellulaire. L'augmentation du CD36, un autre récepteur capable de faire de la captation sélective, pourrait, en partie, expliquer les résultats précédents. De plus, des images prises au microscope confocal démontrent une augmentation du SR-BI à la surface cellulaire, après un traitement à l'AICAR, pouvant ainsi expliquer l'augmentation de l'activité de la captation sélective. Chez la souris, l'augmentation du CHOL-LDL et des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) sanguin est probablement le résultat de la diminution du SR-BI. Étonnamment, le CHOL-HDL plasmatique diminue dans les souris. Ce phénomène peut s'expliquer par une régulation à la baisse de l'apolipoprotéine A-I, une protéine clé dans la formation des HDL. Ce résultat est aussi visible dans le cas des cellules HepG2. Cette régulation semble due à une réduction de l'ARNm de l'apoA-I après un traitement à l'AICAR *in vivo* et à la metformine *in vivo* et *in vitro*. Tandis que l'AICAR *in vitro* semble plutôt la réduire en augmentant sa dégradation via la voie protéasomale. Finalement, l'activation de l'AMPK a pour effet de réduire le cholestérol et les triglycérides intracellulaires dans les cellules HepG2, ce qui correspond donc à un lien entre l'activité de l'AMPK et le métabolisme du cholestérol. L'AMPK pourrait donc devenir la cible thérapeutique de certaines maladies telle que l'athérosclérose.

Mots clés : AMPK, lipoprotéine, rLDL, SR-BI, HDL, LDL, apoA-I, cholestérol.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Maladies cardiovasculaires

À ce jour, les maladies cardiovasculaires sont la première cause de décès en Amérique du Nord. L'une d'entre elles, l'athérosclérose, est une maladie inflammatoire causée par l'accumulation de lipides dans les parois des artères bouchant ainsi la circulation sanguine (revu par Ross, 1999). Un changement vers un mode de vie actif, un arrêt de la consommation de tabac ainsi qu'une bonne alimentation contribuent à la réduction de l'incidence de cette maladie. Par contre, pour la plupart des individus, ce sont des défauts génétiques qui demeurent la première cause de l'athérosclérose. Le principal facteur de risque est la présence d'un haut taux sérique de cholestérol associé aux lipoprotéines de faible densité (LDL), c'est pourquoi cette fraction de cholestérol est appelée le «mauvais cholestérol». À l'opposé, la hausse du cholestérol associé aux lipoprotéines de haute densité (HDL) est positivement associée à une réduction de l'incidence de la maladie, raison pour laquelle ce cholestérol est qualifié de «bon cholestérol». Par ailleurs, l'hypertension et le diabète peuvent aussi augmenter les risques de développer l'athérosclérose (revu par Ross, 1999).

Le développement de l'athérosclérose est caractérisé par plusieurs étapes. Tout d'abord, on dénote un nombre accru de radicaux libres dans la circulation sanguine causant une dysfonction des cellules endothéliales, puis l'expression de molécules d'adhésion sur les parois des artères. Il s'ensuit un recrutement excessif de macrophages et de lymphocytes, ce qui libère une grande quantité de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance pouvant éventuellement provoquer la nécrose cellulaire et la formation de tissus fibreux (revu par Ross, 1999). Les LDL peuvent ensuite rester emprisonnées dans les parois des artères et progressivement s'oxyder devenant ainsi des LDL oxydées (LDLox). Sous cette forme, ces lipoprotéines contribuent davantage aux dommages des parois des artères et au processus d'inflammation (Zhang et Whahl, 2006). Les LDL et LDLox sont ensuite internalisées par les macrophages pour ainsi devenir des cellules

spumeuses, soit une cellule hautement associée à la formation d'athéromes (Steinberg et al, 1997 ; Khoo et al, 1992 ; Han et al, 1997). Ces athéromes forment un bouchon dans les artères, nuisant à la circulation sanguine et mènent à divers problèmes graves tel qu'un accident vasculaire cérébral (revu par Ross, 1999).

1.2 Lipoprotéines

Tel qu'illustré sur la figure 1.1, les lipoprotéines sont remplies de triglycérides (TG) et d'esters de cholestérol (EC) au cœur de leur noyau hydrophobe. Leur surface est composée d'une monocouche de phospholipides contenant du cholestérol libre (CL) ainsi que des protéines appelées apolipoprotéines (apo) (Goldstein et al, 1979).

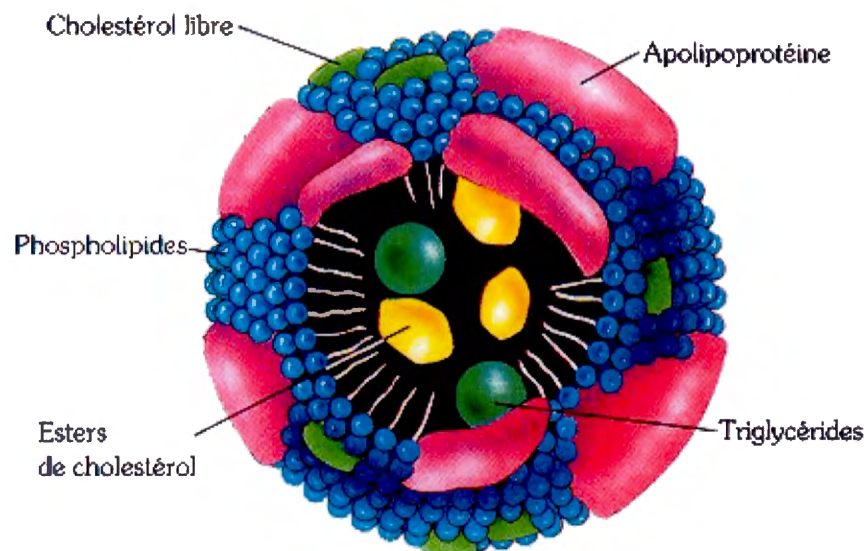


Figure 1.1: Structure des lipoprotéines. *La lipoprotéine est constituée d'une monocouche de phospholipides contenant du cholestérol libre et des apolipoprotéines. Son cœur contient des EC ainsi que des TG.*

Tiré de :

http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=lipoprot%C3%A9ines&lang=4

Les lipoprotéines sont séparées en différentes sous-catégories dépendamment de leur densité, de leur grosseur, de leur fonction, de leur contenu ainsi que de leurs apolipoprotéines (Windmueller et al, 1973). En ordre croissant de densité, on les retrouve

comme suit : les chylomicrons, les LDL, les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et les HDL (Windmueller et al, 1973) (Figure 1.2).

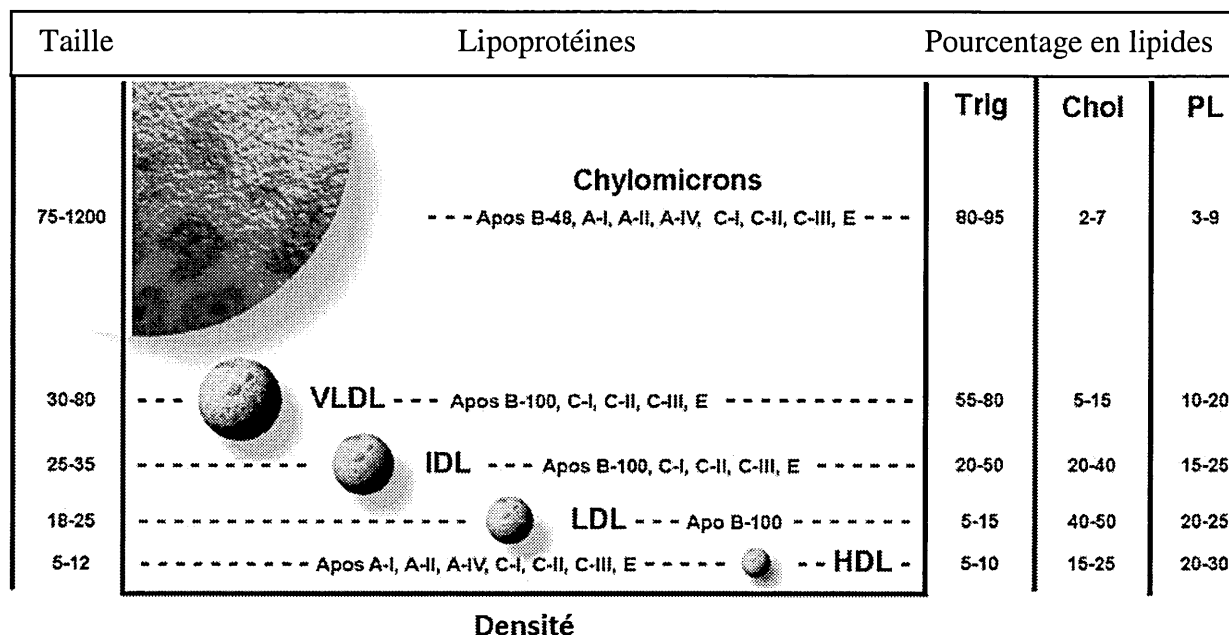


Figure 1.2 : Caractéristiques des différentes classes de lipoprotéines. *Les lipoprotéines sont représentées avec leurs tailles, densités, contenus en triglycérides (Trig), en cholestérol (Chol), en phospholipides (PL) et en apolipoprotéines.*

Adapté de : <http://aimeeblack.com/Lipids/Lipid%20Physiology%201.html>

Les lipoprotéines permettent le transport du cholestérol, des TG et de plusieurs autres constituants à travers la circulation sanguine. Comme certaines molécules sont hydrophobes et de ce fait insolubles dans le sang, elles ne peuvent donc pas être transportées directement dans la circulation sanguine. Ainsi, les lipoprotéines hydrosolubles se chargent du transport de ces molécules vers toutes les cellules du corps (Brown et al, 1974).

1.2.1 Les lipoprotéines de très faible densité et les chylomicrons

Les VLDL transportent des TG et du cholestérol provenant du foie vers les cellules périphériques (revu par Do, 2014). Les VLDL et les chylomicrons sont des lipoprotéines riches en TG associées à une hausse du risque de maladies cardiovasculaires (Miller et al,

2008). Les VLDL présentent à leur surface l'apoB-100, tandis que les chylomicrons présentent l'apoB-48. L'ARNm codant pour l'apoB-100 subit une activité enzymatique post-transcriptionnelle en vue de former l'apoB-48 (revu par Do, 2014). Les VLDL sont d'abord synthétisées dans le foie et relâchées dans la circulation sanguine. Puis, sous l'action de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP), la VLDL acquiert des EC des HDL en échange de TG. D'ailleurs, les VLDL acquièrent leurs apoE des HDL (Brown et al, 1979). La lipoprotéine lipase (LPL) et la lipase hépatique (LH) hydrolysent ensuite les TG des VLDL formant ainsi les IDL (Sigurdsson et al, 1975), des lipoprotéines plus petites et plus denses que leurs précurseurs. Cette action des lipases résultera en une augmentation du contenu en cholestérol et en une diminution de TG de la lipoprotéine. Les IDL pourront être soit captées par les récepteurs des lipoprotéines de faible densité (rLDL) du foie ou continuées d'être hydrolysées par la LPL et LH formant ainsi des LDL (revu par Kwiterovich, 2000).

En dernier lieu, les chylomicrons sont des lipoprotéines jouant un rôle clé dans l'absorption des lipides provenant de l'alimentation. De grande taille et peu dense, elles sont principalement composées de triglycérides. Lors de la digestion, les chylomicrons transportent leur contenu de l'intestin grêle vers les tissus adipeux en passant d'abord dans la lymphe, puis dans le système sanguin (Kiendel et al, 2010).

1.2.2 Les lipoprotéines de faible densité

La LDL, considérée comme athérogène (Brewer et al, 1985), a comme rôle d'amener le cholestérol en provenance du foie vers les cellules périphériques du corps (Goldstein et Brown, 2009). Leur densité et leur grosseur varient selon leur concentration en cholestérol et en TG, les classant ainsi en trois catégories : LDL1, LDL2 et LDL3 (Austin et al, 1988 ; Berneis et Krauss, 2002). La prise du cholestérol des LDL par les cellules se fait majoritairement via le rLDL. Goldstein et Brown ont démontré que la liaison du LDL au rLDL engendre l'endocytose du complexe, la dégradation lysosomale de la lipoprotéine et le recyclage du récepteur à la surface membranaire (Goldstein and Brown, 1986).

Des études plus récentes ont démontré que la LDL peut aussi transférer des EC de façon sélective aux cellules sans entraîner la dégradation de la lipoprotéine. Notre laboratoire a démontré que le « scavenger receptor class B type I » (SR-BI) est responsable de la majeure partie de la captation sélective (CS) des EC de la LDL (Rhainds et al, 2003 ; Brodeur et al, 2005). Le « cluster of differentiation 36 » (CD36) est aussi un récepteur capable d'effectuer la captation sélective des EC des LDL (Connelly et al, 1999 ; Luangrath et al, 2008).

1.2.3 Les lipoprotéines de haute densité

Les HDL, contrairement aux LDL, sont considérées comme anti-athérogènes. En effet, c'est dans les années 70 qu'il fut établi que le cholestérol associé aux HDL (HDL-CHOL) est inversement proportionnel au risque de développer des maladies cardiovasculaires (Miller et Miller, 1975). On retrouve à leur surface différentes apolipoprotéines dont l'apoA-I, l'apoA-II, l'apoA-IV, l'apoC et l'apoE. Les HDL sont séparées en différents sous-groupes selon leur taille. En ordre décroissant on retrouve les HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b et HDL3c (Blanche et al, 1981). Le rôle de cette lipoprotéine est de transporter le cholestérol des cellules périphériques vers le foie pour sa dégradation et son excrétion. Ce phénomène aussi appelé le transport inverse de cholestérol (TIC) permet de diminuer le cholestérol s'accumulant potentiellement dans les parois des artères, réduisant ainsi le risque de formation de plaques d'athéromes (revu par Fisher et al, 2012). Comme c'est le cas pour les LDL, le SR-BI est responsable de la majeure partie de la captation sélective des EC de la HDL (Acton et al, 1996). Le récepteur capable d'effectuer la captation totale de la HDL reste nébuleux. Toutefois, des études récentes démontrent que l'absorption et la dégradation de la HDL sont liées à l'activation d'une «ectopic β -chain of ATP synthase» (Martinez et al, 2003) et du récepteur P2Y13 (Fabre et al, 2010).

La synthèse de la HDL commence par la production de l'apoA-I dans les cellules hépatiques. L'« hepatocyte nuclear factor » 4 α (HNF4 α) est un récepteur nucléaire connu pour influencer positivement l'expression de l'apoA-I (Leclerc et al, 2001 ; Mogilenko et al, 2009). Au total, 45% des apoA-I nouvellement formées sont chargées en lipides dans

le foie avant leur excrétion (Gillard et al, 2009 ; Ji et al, 2012). Une portion d'entre elles sont chargées dans le réticulum endoplasmique de façon indépendante à l'« ATP-binding cassette transporter member 1 » (ABCA1), un transporteur de cholestérol bien étudié chez les macrophages (Kiss et al, 2003). L'autre portion est chargée en lipides dans l'appareil de Golgi de manière dépendante de l'ABCA1 (Maric et al, 2005 ; Nagata et al, 2013). Les apoA-I sont ensuite excrétées dans la circulation sanguine et, encore une fois, l'ABCA1 exporte des lipides (phospholipides et cholestérol libre) aux apoA-I libres, formant ainsi les HDL discoïdales (Hara et Yokoyama, 1991 ; Zhang et al, 2003 ; Alexander et al, 2011). Ces HDL discoïdales, constituées de phospholipides et de cholestérol non-estérifié à leur surface, sont les précurseurs des HDL matures (Lund-Katz et Phillips, 1984). Des individus possédant une mutation perte de fonction pour ABCA1 présentent une diminution du chargement des apoA-I plasmatiques, ce qui provoque une augmentation de leur sécrétion par le rein. Ainsi, une diminution de la quantité de HDL sériques est observée (Rust et al, 1999 ; Wang et al, 1983).

La lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) est une enzyme ayant pour but l'estérification du cholestérol à la surface des HDL discoïdales pour former les HDL matures. Une fois que le cholestérol est estérifié, il devient extrêmement hydrophobe, causant ainsi sa migration vers l'intérieur de la lipoprotéine (revu par Rye et Barter, 2014). Une personne possédant une mutation «perte de fonction» pour la LCAT va présenter une augmentation de ses HDL discoïdales et une diminution de ses HDL matures (Forte et al, 1971 ; Asztalos et al, 2007). Ainsi, une déficience en LCAT chez l'humain cause une diminution de HDL-CHOL (Calabresi et al, 2005).

Par la suite, la HDL subit l'activité de la CETP qui, tel que mentionné ci-haut, a la capacité d'effectuer du transport bidirectionnel d'EC et de TG entre les HDL et les VLDL (revu par Barter et al, 1982). Cette protéine transfère principalement des TG provenant des VLDL vers les HDL et des EC des HDL vers les VLDL équilibrant ainsi leur contenu (revu par Barter et al, 1982). Ce phénomène augmente la grosseur des HDL, car les TG sont de plus grosses molécules que les EC (Rye et al, 1995). L'activité de la CETP fait donc diminuer le niveau de HDL-CHOL et augmenter la grosseur de la HDL. D'ailleurs, les souris transgéniques exprimant la CETP humaine (les souris n'expriment

naturellement pas la CETP) (revu par Barter, 2003) présentent une diminution de HDL-CHOL ainsi que des HDL de plus grandes tailles (Hayek et al, 1992). De plus, les personnes présentant une déficience en CETP ont un phénotype de HDL-CHOL augmenté (revu par Barter et al, 1982). Finalement, après l'action de la CETP, la LH hydrolyse les TG des HDL, relâchant des acides gras et du glycérol alors dans la circulation sanguine (Clay et al, 1991 ; Barrans et al, 1994).

1.3 Récepteurs de lipoprotéines

1.3.1 Le récepteur de LDL

Le rLDL est une glycoprotéine de 160 kDa qui possède sept régions répétées de type A sur la région NH₂-terminale responsable de la liaison avec les apolipoprotéines E et B-100, suivies par un module «EGF-like» (Figure 1.3). Il possède une partie transmembranaire permettant l'ancrage à la membrane plasmique et une partie cytosolique contenant des domaines NPXY (Asn-Pro-X-Tyr) ou PPPSP (Pro-Pro-Pro-Ser-Pro) permettant la localisation des récepteurs (revu par Gwang-Woong et al, 2012). Une seule copie d'apoB-100 est reconnue par un seul rLDL à la fois (Wiklund et al, 1985).

Les rLDL sont internalisés par endocytose à l'aide de puits de clathrine vers des endosomes, le tout à l'aide de la protéine «LDLr adaptor protein» aussi appelée ARH (He et al, 2002). Les conditions acides de l'endosome permettent la dissociation du ligand et du récepteur, ce qui permet le recyclage de celui-ci vers la surface membranaire (revu par Gwang-Woong et al, 2012). L'internalisation de la LDL active trois réponses dans la cellule : la réduction de l'expression du gène 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA réd), l'augmentation de l'activité de l'acyl-Coenzyme A acyltransférase (ACAT) (afin de réduire le cholestérol libre par la génération d'EC) et la diminution de sa propre synthèse via les «sterol regulatory element-binding protein 1» (SREBP-1) et SREBP-2 (Tamura et al, 2005 ; Brown et Goldstein, 1976 ; Streicher et al, 1996 ; Shimomura et al, 1997). Le rLDL peut reconnaître les VLDL et les IDL (Innerarity et al, 1978).

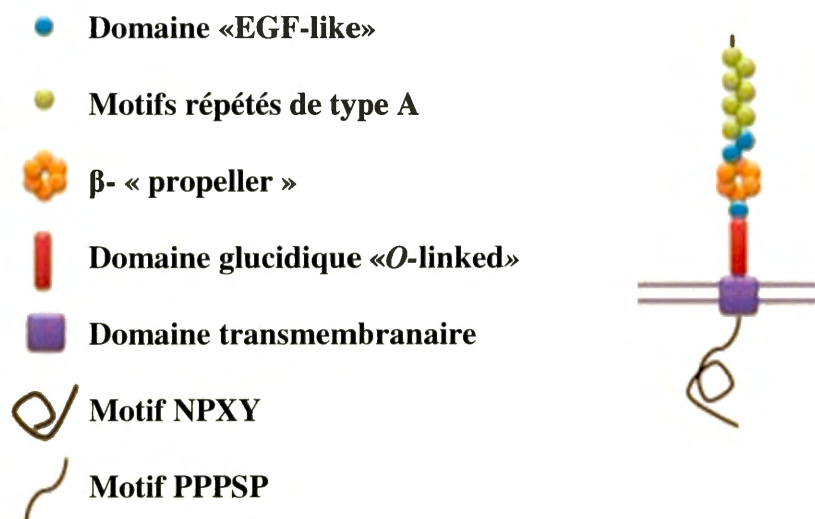


Figure 1.3 : Structure du rLDL. On retrouve sur le rLDL des motifs répétés A, une section β - « propeller », un module « EGF-like », suivi d'un domaine glucidique, un domaine transmembranaire et des motifs permettant la localisation du récepteur (motif NPXY et PPPSP). Adapté de : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3313535/figure/F1/>

Une mutation dans le rLDL est la cause la plus commune d'hypercholestérolémie familiale et de maladies coronariennes précoces (revu par Gwang-Woong et al, 2012). Les patients avec une homozygotie d'une mutation dans le gène codant pour le rLDL présentent un niveau de LDL-CHOL plasmatique de 800 mg/dl (100 mg/dl étant la norme acceptée par les médecins) et une augmentation accrue de la présence de plaques athéromateuses (Brown et Goldstein, 1974). Les souris déficientes en rLDL (-/-) nourries avec une diète riche en cholestérol présentent un profil d'hyperlipidémie et une altération de leurs structures vasculaires (Lauzier et al, 2011 ; Kypreos et Zannis, 2006). Par contre, lorsque des souris rLDL -/- reçoivent un gène codant pour le rLDL, leur niveau de LDL-CHOL et de VLDL-CHOL plasmatique diminue à nouveau (Ishibashi et al, 1993). Des modifications du niveau de rLDL peuvent dépendre de protéines telles que la SREBP (Brown et Goldstein, 1997 ; Horton et al, 1998) et la «proprotein convertase subtilisin/kexin type 9» (PCSK9) (Rashid et al, 2005).

1.3.2 Les «sterol regulatory element-binding proteins»

Les SREBPs, comprenant les isoformes SREBP-1 et SREBP-2, sont une famille de facteurs de transcription jouant un rôle dans l'homéostasie des lipides. SREBP-1, qui se subdivise aussi en SREBP-1a et SREBP-1c, joue un rôle dans le métabolisme des lipides. Plus précisément, la SREBP-1c (forme dominante dans le foie) joue davantage un rôle dans la synthèse d'acide gras en réponse au niveau d'insuline. La SREBP-2, tant qu'à elle, régule plutôt la synthèse du cholestérol endogène (revu par Eberlé, 2004). De ce fait, SREBP-2 est aussi un modulateur agissant sur le métabolisme des lipoprotéines. Une fois synthétisée, la SREBP forme un complexe avec la protéine «SREBP cleavage-activating protein» (SCAP) et s'accumule dans le réticulum endoplasmique. Ce complexe correspond à la forme inactive de la SREBP. Lorsque la cellule est déficiente en stérol, le complexe subit un clivage enzymatique et une translocation vers l'appareil de Golgi pour former la SREBP mature. Celle-ci pourra pénétrer dans le noyau afin d'activer la transcription de différents gènes. Bref, son activité est directement liée au taux de cholestérol de manière à influencer la synthèse du cholestérol endogène par la régulation de l'expression du gène codant pour l'HMG-CoA réductase (Goldstein et Brown, 1997). Elle module aussi le niveau du rLDL en favorisant l'expression de son ARNm (Goldstein et Brown, 1997). En effet, des souris génétiquement modifiées pour exprimer une forme de SREBP-2 tronquée en son régulateur négatif par le cholestérol présentent une hausse de l'ARNm du rLDL (Horton et al, 1998). Par contre, la SREBP-2 agit aussi en induisant l'expression de la PCSK9 (Horton et al, 2007) un régulateur négatif de l'expression du rLDL (Ni et al, 2010). Bref, la SREBP-2 démontre deux effets antagonistes sur le rLDL, soit en augmentant l'expression de l'ARNm du rLDL et en diminuant le nombre de récepteurs de façon post-traductionnelle par l'entremise de PCSK9.

1.3.3 La «proprotein convertase subtilisin/kexin type 9»

La PCSK9 est une protéine de la famille des proprotéines convertases sécrétées dans la circulation sanguine afin de réguler la dégradation des rLDL et par le fait même le niveau de LDL-CHOL (revu par Akram et al, 2010). Cette protéine est connue pour interagir avec le rLDL à la surface cellulaire en se liant à celui-ci. Cette liaison provoque

l'endocytose de ces deux protéines qui sera suivie de leurs dégradations par voie lysosomiale, résultant en une diminution du rLDL. Lorsque les LDL se lient au rLDL des hépatocytes en absence de PCSK9, le récepteur est recyclé vers la paroi cellulaire plutôt que dégradé (Ni et al, 2010). Le cycle de vie du rLDL est schématisé à la figure ci-dessous (Figure 1.4).

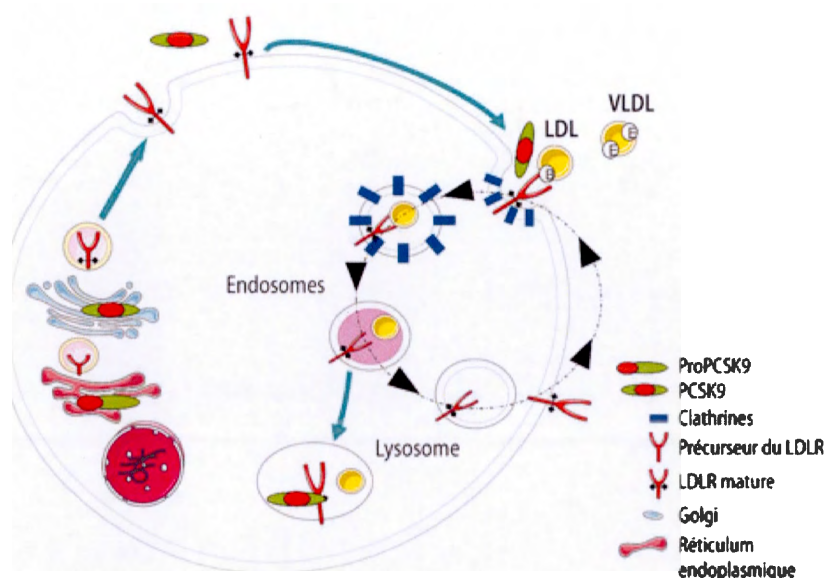


Figure 1.4 : Régulation du rLDL par la PCSK9. *La liaison du PCSK9 au rLDL provoque la dégradation du récepteur plutôt que son recyclage à la surface cellulaire.* Tiré de : Costet et Cariou, 2012

Sans surprise, les individus ayant un gain de fonction du gène codant pour la PCSK9 développent de l'hypercholestérolémie et des maladies cardiovasculaires précoces (revu par Davignon et al, 2010). Au contraire, les personnes possédant une perte de fonction pour ce gène démontrent un faible taux de LDL-CHOL (Mayne et al, 2011) et une diminution de l'incidence de maladies cardiovasculaires (revu par Davignon et al, 2010). Certaines études démontrent que les statines engendrent une augmentation de l'expression de PCSK9, une situation atténuant malheureusement l'effet bénéfique de ce médicament (Rashid et al, 2005). De plus, une délétion du gène codant pour la PCSK9 dans le foie de la souris engendre une augmentation du nombre de rLDL en protéines sans affecter son niveau en ARNm (Rashid et al, 2005). Ces résultats confirment une régulation du rLDL par la PCSK9 de façon post-traductionnelle. De manière encourageante, des essais cliniques en phase II démontrent que des anticorps anti-PCSK9

réduisent significativement le LDL-CHOL plasmatique de 73% lorsqu'ils sont couplés avec des statines (Roth et al, 2012).

1.3.4 Le récepteur «scavenger» de classe B type I

SR-BI est un récepteur de type « scavenger », découvert par le groupe de Dr Krieger, qui est capable d'interagir à la fois avec les HDL, les LDL, les LDLox et les VLDL (Rigotti et al, 2003). Il est codé par le gène SCARB1 formant une protéine de 509 acides aminés avec une masse moléculaire de 82 kDa et possédant des domaines hydrophobes sur chaque côté de la protéine (Figure 1.5) (Rigotti et al, 2003 ; Vinals et al, 2003).

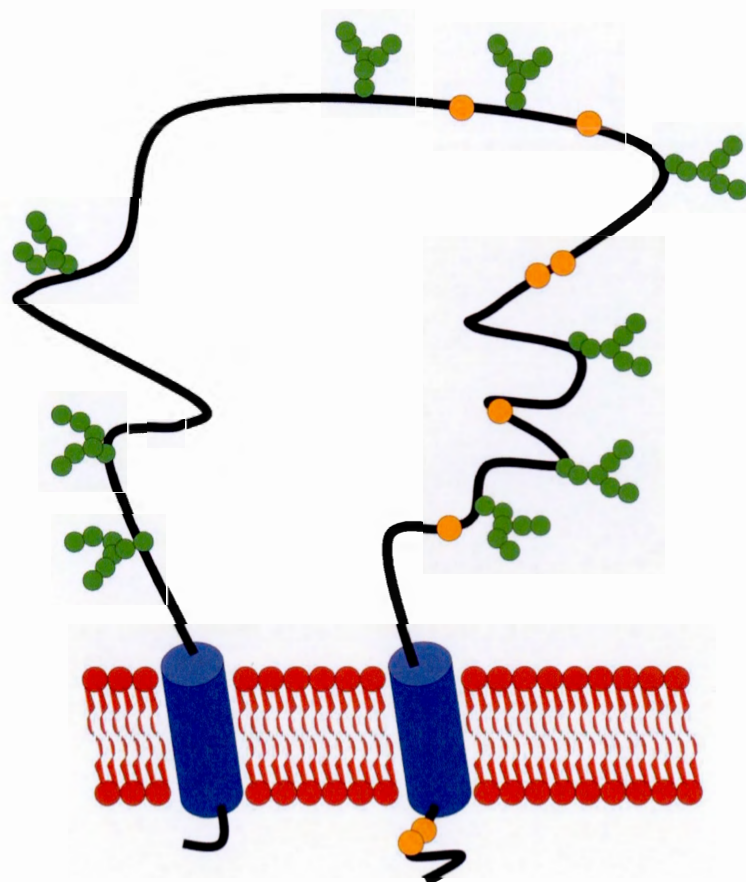


Figure 1.5 : Structure générale de la protéine SR-BI à la surface cellulaire. *SR-BI est un récepteur de type « scavenger » en conformation de fer à cheval inversé. Il forme une protéine de 509 acides aminés possédant plusieurs sites de glycosylation (structures vertes), huit cystéines (points jaunes) et des domaines hydrophobes sur chaque côté de la protéine (structures mauves).* Tiré de : Hoekstra et al, 2010

Depuis près de 20 ans, il est connu que le SR-BI est responsable de la captation sélective des EC des HDL (Acton et al, 1996). D'ailleurs, l'équipe de Docteur Brissette a démontré que le SR-BI est responsable de 85 % de la CS des HDL-EC (Rhains et al, 2003). De plus, la même équipe a démontré que le SR-BI est aussi capable d'effectuer de la captation sélective à partir des LDL (Rhains et al, 2003). En effet, des études sur des cellules HepG2 et dans des souris SR-BI « knock out » (KO) démontrent une perte de 85 % de la captation sélective des LDL-EC comparativement aux souris de type sauvage (Rhains et al, 2003).

Une diminution de l'expression de SR-BI provoque généralement une augmentation du niveau de HDL-CHOL sanguin (Rigotti et al, 1997). Les plus grosses HDL riches en cholestérol et à faible densité se lient plus fermement au SR-BI que les HDL de haute densité ou encore que les apoA-I libres. Par contre, ce sont les apoA-I légèrement lipidées qui présentent la plus grande affinité pour le SR-BI (De Beer et al, 2000 ; Liadaki et al, 2000 ; Williams et al, 2000).

SR-BII est un récepteur provenant d'un épissage alternatif de l'ARNm du SCARB1. Son activité est connue pour être nettement plus faible que celle du SR-BI (Eckhardt et al, 2004). SR-BII agit probablement de façon à pallier une éventuelle diminution de SR-BI. Par exemple, la réduction de SR-BI par l'estrogène engendre parallèlement une augmentation de l'expression de SR-BII (Zhang et al, 2007).

1.3.5 La «PDZ domain containing K1»

La PDZ domain containing K1 (PDZK1) est une protéine capable de se lier au domaine cytoplasmique C-terminal de SR-BI jouant ainsi un rôle de régulation sur celui-ci (Ikemoto et al, 2000 ; Silver, 2002). L'inactivation chez la souris du gène qui code pour PDZK1 provoque la suppression de la quasi-totalité (95%) de l'expression de SR-BI dans le foie, tandis que son niveau diminue de seulement 50% dans l'intestin grêle et reste inchangé dans les macrophages ainsi que dans les organes stéroïdogènes tels que le cortex surrénalien, l'ovaire et le testicule (Kocher et Krieger, 2009). De plus, une mutation sur le domaine C-terminal du SR-BI, empêchant sa liaison avec PDZK1,

provoque la diminution du récepteur sur la surface cellulaire des cellules hépatiques (Silver, 2002). Ceci suggère un rôle clé de PDZK1 dans la localisation membranaire de SR-BI.

1.3.6 Le «cluster of differentiation 36»

CD36, un récepteur de la famille «scavenger» possédant un haut niveau d'homologie avec SR-BI (Baranova et al, 2012), démontre aussi une capacité à faire de la captation sélective. Il se retrouve principalement au niveau du foie (Maeno et al, 1994) et des macrophages (Greenwalt et al, 1992). Des études effectuées par le groupe de la Dre Brissette démontrent que des souris double KO SR-BI/CD36 perdent complètement leur capacité à faire de la captation sélective des LDL-EC contrairement aux souris sauvages ou SR-BI KO (Luangrath et al, 2008). Bref, SR-BI et CD36 seraient aptes à effectuer la CS des LDL-EC, toutefois l'étude de Luangrath et al (2008) suggère que CD36 serait surtout actif en absence de SR-BI.

1.4. L'«adenosine monophosphate-activated protein kinase»

L'adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) fait partie d'une famille de sérine/thréonine kinases hautement conservée durant l'évolution (Kahn et al, 2005). L'AMPK est formée d'une sous-unité catalytique (AMPK α) ainsi que de deux sous-unités régulatrices (AMPK β et γ) (Figure 1.6). Toutes les sous-unités présentent différentes isoformes, soient α 1, α 2, β 1, β 2, γ 1, γ 2 et γ 3, pouvant être combinées pour former douze différentes combinaisons d'AMPK (revu par Hardie, 2011). Elle contient un motif répété de cystathionine β synthase (CBS) (Bateman, 1997) impliqué dans la liaison de l'adénosine triphosphate et de l'adénosine monophosphate (ATP, AMP), soit une étape critique dans la régulation de l'AMPK (revu par Hardie, 2011). L'isoforme AMPK α 1 est principalement exprimée dans le foie et dans les tissus adipeux, tandis que l'AMPK α 2 se retrouve davantage dans le cerveau, le cœur et les muscles squelettiques (O'Neill et al, 2013).

Il est déjà bien établi que l'AMPK joue un rôle clé dans le métabolisme énergétique de la cellule (revu par Hardie, 2011). En effet, un déséquilibre dans le ratio ATP/AMP provoque l'activation de la kinase, et ce, par la liaison de l'AMP sur l'AMPK libérant ainsi la sous-unité catalytique de la kinase qui peut alors être activée. L'AMPK peut être phosphorylée sur sa thréonine 172 par trois kinases principales, soit la «liver kinase B1» (LKB1) (Woods et al, 2003), la «Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase» (CaMKK) (Hurley et al, 2005) et la «transforming growth factor beta-activated kinase 1» (TAK1) (Momcilovic et al, 2006). Son activation inhibe les voies anaboliques au profit des voies cataboliques comme la β -oxydation (Hardie, 1989 ; Grossman et al, 2006). On remarque aussi l'augmentation de la prise de glucose par la cellule (Kurth-Kraczek et al, 1999), la synthèse des acides gras (Hardie et Pan, 2002), la synthèse du cholestérol (Henin et al, 1995), et l'autophagie (Egan et al, 2011).

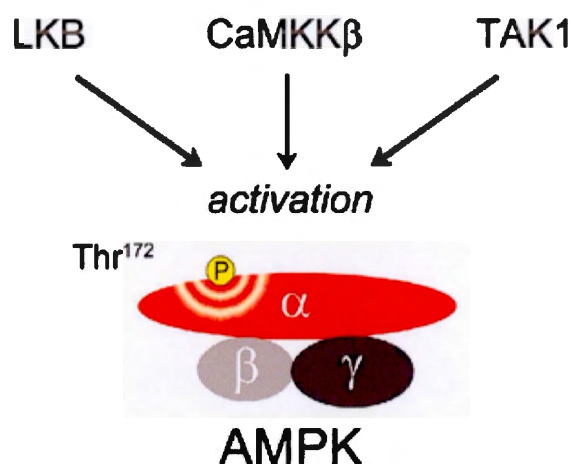


Figure 1.6 : Structure de la protéine AMPK et les différentes kinases pouvant la phosphoryler. L'AMPK est formée d'une sous-unité catalytique (AMPK α) ainsi que de deux sous-unités régulatrices (AMPK β et γ). Elle peut être phosphorylée sur sa thréonine 172 par trois kinases principales, soit la «liver kinase B1» (LKB1), la «Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases» (CaMKK) et la «Transforming growth factor beta-activated kinase 1» (TAK1). Tiré de: <http://www.intechopen.com/books/medical-complications-of-type-2-diabetes/targeting-ampk-for-therapeutic-intervention-in-type-2-diabetes>

L'activation de l'AMPK peut être engendrée par différents mécanismes. D'abord, la liaison de l'adénosine diphosphate (ADP) sur sa sous-unité γ inhibe la déphosphorylation de l'AMPK, augmentant ainsi le ratio AMPKp/AMPK (Xiao et al, 2011). De plus,

l'AMP peut allostériquement activer l'AMPK en changeant sa conformation pour rendre accessible son site de phosphorylation (Thr-172) aux différentes kinases (Xiao et al, 2011). En outre, la liaison de l'AMP peut aussi protéger l'AMPK de différentes phosphatases (Davies et al, 1995). Au contraire, la liaison de l'ATP sur le site allostérique provoque un changement de conformation de l'AMPK, permettant sa déphosphorylation par les phosphatases (Xiao et al, 2011). Dans des conditions basales, le niveau de phosphorylation de l'AMPK total est déterminé par un équilibre entre la phosphorylation et la déphosphorylation de celle-ci (Hawley 2003).

Une augmentation du ratio AMP/ATP permet l'activation de l'AMPK à la suite d'un stress énergétique tels que l'activité physique, le jeûne, l'absence de glucose ou bien l'hypoxie (Xiao et al, 2011). Certains signaux hormonaux tels que l'insuline et la leptine inhibent l'AMPK alors que la ghréline active l'AMPK (Xiao et al, 2011). La metformine et le 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR) sont d'ailleurs deux molécules pharmacologiques hautement utilisées comme activateur de l'AMPK (Xiao et al, 2011).

1.4.1 La metformine

La metformine est une biguanide massivement prescrite afin de traiter les patients atteints de diabète de type II (Kahn et al, 2005). Son rôle est de réguler le niveau de glucose sanguin par différents mécanismes cellulaires. Son activité provoque la translocation du «Glucose transporter type 4» (GLUT4) vers la membrane plasmique de la cellule musculaire squelettique (Cushman et al, 1998 ; Kurth-Kraczek et al, 1999). Celui-ci transporte le glucose vers l'intérieur de la cellule réduisant ainsi sa teneur sanguine (Lee et al, 2011). Les effets thérapeutiques sont principalement visibles dans le foie, car celui-ci exprime de façon abondante le transporteur « organic cation transporter 1 » (OCT1), la porte d'entrée de la metformine (Wang et al, 2002). Biochimiquement parlant, cette biguanide agit en inhibant la chaîne de transport des électrons, ce qui diminue le ratio ATP/AMP (Owen et al, 2000). Cet effet aura comme conséquence d'activer l'AMPK (Owen et al, 2000). De façon surprenante, un groupe de chercheur a démontré que l'inhibition de la production du glucose hépatique par la metformine est causée par l'arrêt

de la chaîne de transport des électrons de façon indépendante à l'activation de l'AMPK (Foretz et al., 2010). En effet, ils ont démontré que cette modulation physiologique par la metformine est toujours visible même chez des souris AMPK KO spécifiquement au niveau du foie, suggérant ainsi la possibilité de l'existence d'un autre mécanisme complémentaire à celui de l'AMPK (Foretz et al, 2010).

1.4.2 L'AICAR

L'AICAR est une molécule non-pharmaceutique connue pour activer l'AMPK en mimant l'AMP endogène, diminuant le ratio AMP/ATP (Corton et al, 1995). En effet, l'AICAR est transformé dans la cellule en ZMP, soit un analogue de l'AMP, capable de se lier au domaine CBS de l'AMPK pour une activation allostérique (Corton et al, 1995). Il agit aussi sur l'AMPK en augmentant sa phosphorylation par la kinase LKB1 (Hawley et al, 2003). L'AICAR n'a malheureusement pas un bon potentiel pharmaceutique, car il est difficilement absorbé par le corps et a une demi-vie très courte (Coughlan et al, 2014).

1.4.3 Effet de l'activation de l'AMPK

Lorsqu'activée, l'AMPK a aussi pour effet de diminuer la quantité de cholestérol hépatique par l'inhibition de l'HMG-CoA réductase (Henin et al, 1995), l'enzyme synthétisant le mévalonate à partir de l'HMG-CoA lors de la synthèse du cholestérol endogène (Brown et Goldstein, 1980). Une étude démontre que l'activation de l'AMPK par la metformine réduit le niveau d'expression de l'ARNm de l'HMG-CoA réductase dans le foie de rat (Guigas et al, 2006). Par contre, des traitements à l'AICAR ne démontrent aucune modification significative sur le niveau d'ARNm de l'HMG-CoA réductase dans le foie de rat. L'activation de l'AMPK par l'AICAR aurait seulement une influence négative sur l'activité de l'HMG-CoA réductase (Zhou et al, 2001). D'ailleurs, un traitement à l'AICAR dans des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) et dans des cellules endothéliales d'aorte de porc suggère aussi une diminution de l'activité de l'HMG-CoA réductase de 37% et 33% respectivement (Fisslthaler et al, 2007).

L'AMPK agit aussi en inhibant la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, une étape précurseur dans la synthèse d'acides gras, en phosphorylant l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) au niveau hépatique (Davies et al, 1992). Chez les souris, l'activation de l'AMPK a pour effet de phosphoryler l'isoforme ACC1 sur la sérine 79 et l'isoforme ACC2 sur la sérine 212 (Fullerton et al, 2013). D'ailleurs, il est bien documenté que la phosphorylation de l'AMPK réduit l'expression de SREBP-1 (Li et al, 2011), un facteur de transcription pour l'ACC1 (Hardie, 1989), jouant un rôle dans le métabolisme des acides gras (Bianchi et al, 1990 ; Thampy, 1989). Il n'est donc pas surprenant qu'un traitement à l'AICAR chez des rats, nourris avec une diète normale ou riche en gras, démontre une réduction significative de TG hépatiques comparativement aux rats contrôles (Henriksen et al, 2013).

En sachant le rôle de l'AMPK dans l'homéostasie énergétique de la cellule, il est logique de penser que cette kinase aurait un rôle important dans le métabolisme des lipoprotéines. D'ailleurs, des études faites par le groupe de Spencer et Jones ont déjà démontré une forte association dans la régulation du variant $\alpha 2$, la sous-unité catalytique d'AMPK, avec leur niveau de CHOL-LDL dans le plasma de femmes caucasiennes (Spencer-Jones et al, 2006). Fait intéressant, il fut documenté que l'activation de l'AMPK a comme effet d'augmenter l'ARNm du rLDL (Wang et al, 2008), ce qui pourrait potentiellement avoir un effet direct sur le métabolisme des LDL. En effet, un traitement à l'AICAR dans les cellules HepG2 engendre l'augmentation de l'expression du rLDL de façon AMPK $\alpha 2$ -dépendante (Wang et al, 2008). D'autres chercheurs ont démontré que l'AICAR agit plutôt en stabilisant le taux d'ARNm du rLDL en fonction de la dose en passant par la voie ERK indépendamment de celle de l'AMPK dans les cellules HepG2 (Yashiro et al, 2013). De façon surprenante, l'induction de l'AMPK par la caféine, dans les cellules HepG2, a pour effet de diminuer l'expression du rLDL ainsi que celle du SREBP-2, ce qui ne corrèle pas avec les autres études (Quan et al, 2013).

Dans les muscles squelettiques, l'AICAR active préférentiellement l'isoforme AMPK $\alpha 2$ tandis que la metformine active plutôt l'isoforme AMPK $\alpha 1$ (Bogachus et Turcotte, 2010). Ceci indique clairement que bien que les deux drogues sont des activateurs d'AMPK, certains mécanismes peuvent différer.

Un traitement à l'AICAR augmente significativement le niveau en ARNm et en protéines de l'«ATP-binding cassette sub-family G member 1» (ABCG1), un transporteur de cholestérol vers les HDL, et ce, sans influencer le niveau d'ABCA1, de SR-BI et de CD36 dans les macrophages spumeux de souris déficientes en apoE. C'est en stabilisant le niveau de l'ARNm plutôt qu'en agissant sur sa transcription que l'AICAR régule le niveau d'ABCG1 (Li et al, 2010).

Dans un autre ordre d'idées, des chercheurs expliquent que le SR-BI et la PDZKI peuvent contribuer au système qui induit la phosphorylation de l'AMPK par l'intermédiaire des HDL dans des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines. En effet, des cellules exposées aux HDL induisent la phosphorylation de l'AMPK seulement lorsque les protéines SR-BI et PDZKI sont exprimées normalement (Kimura et al, 2010). De façon similaire, l'apoA-I est aussi capable de stimuler la phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC dans des myocytes de souris C2C12 (Han et al, 2007). De plus, la même étude démontre que des souris apoA-I (-/-) présentent une diminution de la phosphorylation de l'AMPK dans les cellules musculaires squelettiques et dans les cellules du foie (Han et al, 2007).

Finalement, l'activation de l'AMPK par l'AICAR, dans des hépatocytes de rat en culture, cause une diminution du niveau de HNF4 α et de son activité. L'AMPK inhibe l'HNF4 α par plusieurs mécanismes : par phosphorylation directe, en inhibant aussi la transcription de son gène, en augmentant sa dégradation et en empêchant la liaison de celle-ci à l'ADN de gènes cibles (Hong et al, 2003).

1.5 Problématique, hypothèses et objectifs de travail

Comme les maladies cardiovasculaires sont très répandues en Amérique du Nord, les études axées sur leur compréhension fondamentale sont cruciales. Mieux comprendre la modulation des éléments jouant un rôle clé dans le développement de ces maladies pourrait aider à la création de nouveaux traitements. Présentement, les statines sont les principaux médicaments prescrits pour traiter la maladie. Ils agissent en inhibant l'activité de l'HMG-CoA réd, ce qui résulte en une diminution de la synthèse de

cholestérol endogène (revu par Istvan et Deisenhofer, 2001). Ceci aura comme conséquence de diminuer le niveau de cholestérol cellulaire hépatique, ce qui aura comme effet d'augmenter l'expression du rLDL, un mécanisme de compensation qui a pour but la prise en cholestérol exogène via les LDL/VLDL (Halcox et Deanfield, 2004). Par contre, ce médicament peut causer de sévères douleurs musculaires ou encore, être complètement inefficace chez certains patients. Des traitements alternatifs doivent alors être considérés. Comme l'AMPK est un senseur énergétique important de la cellule, il paraît un candidat idéal pour réguler le métabolisme des lipoprotéines. D'ailleurs, la metformine, un médicament déjà prescrit chez des patients diabétiques, agit, entre autres, en activant l'AMPK. De façon intéressante, des analyses de sérum prélevé chez des patients traités avec de la metformine ont démontré une baisse de LDL-CHOL, un phénotype très avantageux pour diminuer l'incidence de l'athérosclérose (Bolen et al, 2007). Nous supposons donc que l'activation de l'AMPK jouerait un rôle dans la régulation des lipoprotéines de façon à réduire l'incidence des maladies cardiovasculaires.

Étant donné les connaissances actuelles dans la littérature ainsi que le rôle clé de l'AMPK dans le métabolisme énergétique du corps, il est fort probable que son activation aura comme effet de réguler certains éléments reliés aux lipoprotéines. En sachant que la metformine et l'AICAR agissent sur l'activation de l'AMPK par des voies bien différentes, il ne serait pas surprenant d'observer certaines divergences dans les résultats. Comme l'AICAR est un activateur plus direct sur l'AMPK, nous supposons que celui-ci aura plus d'effets drastiques que la metformine.

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'effet de l'activation de l'AMPK sur différents éléments jouant un rôle dans le métabolisme des lipoprotéines. Nous avons donc traité des souris soit en leur injectant de l'AICAR ou bien en les gavant avec de la metformine, et ce, chaque jour pendant 14 jours. Des cellules HepG2 ont aussi été traitées pendant 24h afin de voir l'effet de deux activateurs de l'AMPK dans un contexte *in vitro* et *in vivo*.

Le premier manuscrit porte exclusivement sur l'activation de l'AMPK chez la souris. Ce modèle animal permet de mieux comprendre le lien entre l'AMPK et le métabolisme des lipoprotéines dans un milieu systémique. De plus, les traitements peuvent être

administrés chaque jour, pendant plusieurs jours, afin de mimer une activation chronique de l'AMPK. Des modifications sur le profil lipidique sanguin peuvent aussi être quantifiées. Ce modèle permet aussi de réaliser des études de clairance de lipoprotéines.

Le deuxième papier traite de l'effet de l'activation de l'AMPK dans les cellules HepG2, une lignée cellulaire stable provenant d'un hépatocarcinome d'origine caucasienne mâle. Ceci permet de vérifier si les résultats obtenus chez la souris peuvent être transposés chez l'humain. De plus, des études *in vitro* permettent l'analyse de la cinétique d'activation de l'AMPK dans un laps de temps très court. Elles permettaient aussi de pousser plus loin l'étude concernant les effets sur l'apoA-I, la constituante majeure des HDL.

CHAPITRE II

EFFECT OF METFORMIN AND AICAR ON DETERMINANTS OF LIPOPROTEIN METABOLISM IN THE MOUSE

^{1,2,6}Ghizlane Gaougaou, ^{1,3,6}François Dallaire, ⁴David Rhainds, ^{1,5}Corine Martineau, ¹Jade Desjardins and ¹Louise Brissette*

¹Laboratoire du métabolisme des lipoprotéines, Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Qc, Canada, H3C 3P8

²Present address: INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Qc, Canada, H7V 1B7

³Present address : Institut de Cardiologie de Montréal, Montréal, QC, Canada, H1T 1C8

⁴Groupe de recherches sur l'athérosclérose, Institut de Cardiologie de Montréal, Montréal, Qc, Canada, H1T 1C8

⁵Present address : Unité de génétique, Hôpital Shriners pour enfants de Montréal, Montréal, Qc, Canada, H3G 1A6

⁶Co-first authors

Running title: Effects of AMPK activation in mouse

*To whom correspondence should be addressed:

Louise Brissette, Ph.D.

Professor

Département des sciences biologiques

Université du Québec à Montréal

CP 8888, succ. Centre-Ville

Montréal (Québec)

Canada H3C 3P8

E-mail: brissette.louise@uqam.ca

Répartition du travail pour le premier manuscrit

La répartition du travail reflète précisément l'ordre des noms des auteurs de l'article. La première auteure, Ghizlane Gaougaou, a effectué tous les traitements chez les souris, une partie des westerns blots, les dosages de triglycérides, de CHOL-total, CHOL-HDL et de CHOL des lipoprotéines à apoB (VLDL + LDL) ainsi que la clairance de la HDL. Elle a donc participé à la collecte des données des tableaux 2.2 et 2.3 en équipe, des figures 2.1 et 3 en équipe et des figures 2.2 et 2.4 majoritairement seule. En tant que co-premier auteur, j'ai participé à la rédaction du manuscrit, la majorité des westerns blots, les qPCR et aux mesures de CHOL-total. J'ai donc récolté les données des tableaux 2.2, 2.3 et 2.5, du dosage de l'apoA-I plasmatique par ELISA de la figure 2.2, des figures 2.1 et 2.3 en équipe et j'ai confectionné le schéma de la figure 2.5. David Rhainds, quant à lui, a participé à l'élaboration du projet et à l'écriture du papier. Jade Desjardins et Corine Martineau furent de précieuses aides techniques lors des westerns blots et des qPCR. Finalement, la Dre Louise Brissette est la professeure chercheuse qui a élaboré, supervisé et financé le projet, tout en écrivant la grande majorité du papier.

2.1 SUMMARY

AMP-stimulated protein kinase (AMPK) is a master regulator of metabolic pathways. In the liver, a number of AMPK targets have been identified, including the key enzyme for cholesterol biosynthesis, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR). However, the consequences of this phosphorylation event on cholesterol homeostasis and lipoprotein metabolism have not been thoroughly investigated. To this end, wild-type C57Bl/6 mice were treated for two weeks with saline or the AMPK activators, 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICAR) and metformin (Met). Both drugs activated liver AMPK as shown by 61 and 39% increases in AMPK phosphorylation for AICAR and Met respectively, as well as parallel increases in acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC) phosphorylation by 2.6-fold and 32% for AICAR and Met. The strong effect of AICAR on AMPK and ACC phosphorylation resulted in decreased hepatic triglycerides (TG) and total cholesterol (-25% and -20%), while Met reduced total cholesterol, but not hepatic TG. Accordingly, both drugs decreased hepatic HMGCR protein by 68 and 45% respectively. We reasoned that these effects could translate into reduced plasma lipid levels. Indeed, plasma total cholesterol was decreased by 15% after both treatments, which was due to a 20-30% decrease in HDL-cholesterol levels. This was accompanied by lower plasma apoA-I levels in AICAR-treated mice (-54%). As protein and mRNA levels of the HDL receptor SR-BI were decreased by 45-50% after both treatments and translated into reduced fractional catabolic rates for HDL-associated cholesteryl esters, the decrease in HDL-C likely occurred through other mechanism(s). Indeed, both drugs reduced apoA-I protein and mRNA levels and acted via reduced expression of the transcription factor HNF4a protein, a known AMPK target, by 33% for AICAR and 45% for Met. Thus, it appears that reduced availability of cholesterol and apoA-I for HDL biogenesis were responsible for the hypocholesterolemic effect of AMPK activators in mice. It would be important to investigate the potential effects of these drugs in mice with a humanized lipoprotein profile.

Supplementary keywords: LDL/metabolism; HDL/metabolism; cholesterol; receptors/lipoprotein; triglycerides; scavenger receptors; LDL-receptor; SR-BI; selective uptake

2.2 INTRODUCTION

It is well established that high levels of plasma cholesterol (CHOL) associated with low density lipoproteins (LDL) increase the risk of developing atherosclerosis (Brewer et al, 1985). In contrast, high density lipoproteins (HDL) are considered as anti-atherogenic particles because they bring peripheral cell CHOL to the liver for excretion, a process known as reverse cholesterol transport (RCT) (reviewed in Fisher et al, 2012). The level of LDL in the blood circulation is related to the synthesis rate of their precursors (very low density lipoproteins (VLDL)), the conversion rate of VLDL into LDL and their uptake by the liver. A large part occurs through the LDL-receptors (LDLr) which take up the entire LDL particles for their complete degradation (Goldstein and Brown, 1974), a mechanism referred to as the holoparticle pathway. LDL can also selectively transfer their cholesterol esters (CE) to cells without concomitant degradation of their apolipoproteins, a process termed CE selective uptake (SU). We have shown that the scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is responsible for LDL-CE SU (Rhainds et al, 2003 ; Brodeur et al, 2005) and that in absence of SR-BI, the cluster of differentiation-36 (CD36) shows a CE SU activity towards LDL (Luangrath et al, 2008). Regarding HDL metabolism, it has been known for two decades that SR-BI has the ability to selectively take up CE from HDL (Acton et al, 1996). The splice variant SR-BII is less effective than SR-BI for HDL-CE SU (Eckhardt et al, 2004). The identity of the receptor involved in HDL holoparticle uptake for ultimate degradation remained for a long time elusive, but more recently evidences emerged that HDL uptake and degradation is linked to activation of ecto-F₁-ATPase (Martinez et al, 2003) and P2Y₁₃ (Fabre et al, 2010).

AMP-activated protein kinase (AMPK) is an enzyme playing an important role in whole body energy. Interestingly its activation was shown to affect some key players in lipid and lipoprotein metabolism. Thus, activated AMPK reduces CHOL and fatty acid synthesis by phosphorylating 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase (Henin et al, 1995) and acetyl-CoA carboxylase (ACC) (Davis et al, 1992). It also reduces expression of sterol regulatory element-binding proteins (SREBP)-1 (Zhou et al, 2001). SREBP-1c which is the major SREBP-1 isoform in the liver (Shimomura et al, 1997) coordinates fatty acid synthesis (Dentin et al, 2004). Differently, SREBP-2

positively regulates the expression of HMG-CoA reductase, LDLr (Shimomura et al, 1997) and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) genes. PCSK9 is a protein linked to LDLr degradation, thus LDLr level. It was also reported that activation of AMPK increases LDLr mRNA levels (Wang et al, 2008). Moreover, hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α , which enhances the expression of apoA-I gene, is phosphorylated and inactivated by AMPK (Hong et al, 2003). Unfortunately, none of these studies addressed the effects of AMPK activation on a more complete set of key players in lipid and lipoprotein metabolism in relation with the lipid status of liver and blood in an animal model. Thus our objective was to describe the effects of a 2 week-treatment with 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) or metformin, two AMPK activators, on mouse LDL- and HDL-CHOL levels, on liver CHOL and triglyceride (TG) content, and on key determinants of LDL and HDL levels (receptors, transcription factors and other relevant proteins) in the mouse model.

The biguanide drug metformin is frequently prescribed to control glycemia in T2D subjects. It does so mainly by deploying glucose transporter type 4 (GLUT4) to the plasma membrane to favor glucose uptake in skeletal muscle cells (Lee et al, 2011). Metformin also reduces blood TG levels (Lee et al, 2011). The therapeutic effects of the drug are primarily on the liver, probably because of the predominant hepatic expression of the organic cation transporter OCT1 (Wang et al, 2002) involved in this drug's uptake. Metformin inhibits the electron transport chain causing a higher pool of AMP which allosterically activates AMP-activated protein kinase (AMPK) (Owen, 2000). Moreover AMP changes the conformation of AMPK, allowing the tumor suppressor liver kinase B1 (LKB1) to phosphorylate and activate it (Woods et al, 2003). Although not used in humans, AICAR, an adenosine analog that is taken up by the cells and which is phosphorylated to form an AMP mimetic (Corton et al, 1995), also activates AMPK by LKB1-mediated phosphorylation (Hawley et al, 2003).

We found that the two drugs increased LDL/VLDL-CHOL levels in mice, which could be associated with a reduced SR-BI expression level. They also decreased plasma HDL-CHOL levels which are linked to a reduction of HNF-4 α and consequently to a lower apoA-I level. This study also revealed that both drugs decrease liver CHOL and HMG-

CoA reductase levels and that they both increase SREBP-2 and PCSK9 levels. However their actions differ on hepatic TG, ACC, SREBP-1c and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) proteins and on LDLr mRNA abundances.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 Materials

Human plasma was purchased from Bioreclamation Inc. (Westbury, New York, USA). Commercial kits for CHOL and TG came from Wako Chemicals (Richmond, Virginia, USA) and Sigma-Aldrich (St-Louis, Missouri, USA), respectively, while the mouse apoA-I Elisa kit was purchased from MyBioSource (San Diego, California, USA). AICAR was obtained from Toronto Research Chemical Inc. (Toronto, Ontario, Canada) and metformin from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA). Anti-ACC, anti-pACC, anti-pAMPK, and anti-PCSK9 were from Abcam (Toronto, Ontario, Canada), anti-SREBP-1c from Santa Cruz (Dallas, Texas, U.S.A) and all other antibodies from Novus Biologicals (Oakville, Ontario, Canada).

2.3.2 Animals and treatments

C57BL/6 mice (6-9 week old) were obtained from Charles River Laboratories (Saint-Constant, Québec, Canada). Mice were maintained with a 12 h day/night cycle at 23°C in the animal facility of Université du Québec à Montréal (UQAM) and fed with a standard mouse chow and water *ad libitum*. Mice were treated with 0.5 mg/g of body weight per day of either AICAR or metformin in a volume of 200 µl for 14 days. AICAR was dissolved in phosphate buffered saline (PBS) and injected in the peritoneal cavity as in Jørgensen et al (2007). Metformin diluted in water was administrated by gavage as in Kim et al, (2008). Control mice received only the vehicle. On the last day of treatment, mice were fasted for 1 hour (to minimize blood chylomicron levels), anesthetized with isoflurane and their blood and liver were collected. All experiments were performed in accordance with the principles and guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and under protocol R2-673 approved by the ethical committee of UQAM.

2.3.3 Lipid and apoA-I level determinations

Plasma was obtained by centrifugation of blood at 2000 g during 15 minutes at 4°C. HDL and LDL were separated by a modification of the method of Asztalos et al, (2005). Briefly, apoB-containing lipoproteins were precipitated from mouse plasma by adding an

equal amount of PEG 6000 (20% in 0.2 M glycine, pH 7.4) and centrifuged at 2000 g for 15 minutes at 4°C. The apoB-containing lipoproteins were re-suspended in 0.45 M NaCl and tested for CHOL. HDL-CHOL was calculated from the subtraction of non-HDL-CHOL from total plasma CHOL. Prior to the estimation of hepatic CHOL and TG, lipids were extracted as previously described by Folch et al, (1957). CHOL and TG levels, as well as plasma apoA-I were quantified with kits according to manufacturer's recommendations.

2.3.4 HDL₃ isolation and labelling

Before isolation, plasmas from three different normolipidemic subjects were pooled and adjusted to 0.01% EDTA, 0.02% sodium azide, 10 µM PMSF, and 10 µM Trolox. Plasmas were pooled in order to minimize the effects of a plasma sample with atypical HDL. HDL₃ were isolated from human plasma using the protocol of Hatch and Lees (1968) between densities of 1.125-1.210 g/ml as described by Brissette, Charest and Falstrault (1996). HDL₃ were iodinated by a modification of the iodine monochloride method of McFarlane (1948). One mCi of Na¹²⁵I was used to iodinate 2.5 mg of HDL₃ with 30 nmol of iodine monochloride in 0.5 M glycine-NaOH, pH 10. Free iodine was removed by gel filtration on Sephadex G-25 followed by an overnight dialysis in Tris-buffered saline. [³H]cholesteryl oleate was used to radiolabel HDL₃ in their CE, as described by Roberts et al, (1985). Thereafter labelled HDL₃ were isolated by ultracentrifugation as described earlier.

2.3.5 Lipoprotein clearance *in vivo*

Control and AICAR treated mice were fasted 1 hour before lipoprotein injection in tail vein with a bolus of human HDL₃ containing 480 µg of non-radiolabelled HDL₃ and 20 µg of HDL₃ radiolabelled with either ¹²⁵I or [³H]-CE in 150 µl of saline as in (Brodeur et al, 2005). After the injection, a blood sample was collected from exposed saphenous vein at 0, 0.25, 0.5, 1, 3, 8 and 24 hours and centrifuged at 7500 g for 15 minutes at 4°C. [³H]-CE was directly radioassayed from plasma whereas ¹²⁵I was measured in the trichloroacetic acid-precipitable fraction to eliminate any trace of free radioactive iodine. The plasma disappearance curves were generated by dividing the plasma radioactivity at

each point by the radioactivity determined 2 minutes after tracer injection. Plasma fractional catabolic rates (FCRs) were calculated using a two-compartment model according to the model of Matthews (1957).

2.3.6 Immunoblotting

Cell proteins were obtained by harvesting with RIPA buffer containing protease inhibitors. Proteins (50 µg) were separated by 9% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by transfer to nitrocellulose membrane for Western blotting. The nitrocellulose membranes were blocked with 5% non-fat milk powder for 2 hours at room temperature in TBST (20 mM Tris, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20). Membranes were incubated overnight at 4°C with antibodies against SREBP-2, ABCA1, apoA-I, HNF-4α, pACC or LDLr at 1/1000 dilution, or antibodies against pAMPK at 1/1500 dilution, or antibodies against ACC, CD36, PDZK1 or SREBP-1c at 1/2000 dilution, or antibodies against PCSK9 or SR-BII at 1/3000 dilution, or antibodies against HMG-CoA reductase or SR-BI at 1/5000 dilution, or antibodies against β-actin at 1/10000 dilution in TBST containing all 5% milk powder, with the exception of antibodies against HNF-4α, LDLr, pAMPK which were in TBST plus 1%, 0.5% and 5% BSA, respectively. Thereafter, membranes were washed thrice for 5 minutes with TBST and incubated with the secondary antibodies (goat anti-rabbit or anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase) diluted in TBST for one hour at room temperature. The membranes were washed three times for 5 minutes with TBST and the bands visualized using enhanced chemiluminescence (Millipore, Billerica, Massachusetts USA) and HyBlot CL™ (Denville Scientific Inc., Metuchen, New Jersey, USA). Ratios of detected proteins and of their loading controls (β-actin) were obtained using ImageJ software. Controls were reported on 100% and the fold change for each protein was calculated by comparing results from treated mice with those of control mice.

2.3.7 mRNA quantification by qPCR

Liver total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, New Mexico, USA) following the manufacturer's instructions. One µg of RNA was reversed transcribed with the Omniscript kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). qPCR was then performed

with the iCycler IQ detection system (BioRad, Hercules, CA, USA) using SYBRgreen (BioRad). β 2-microglobulin was used as the internal reference gene. Primers used for different qPCR are listed in Table 1. The PCR were run for 45 cycles with an annealing temperature of 60°C for 30 secondes. The expression of each gene was normalized to gene expression of β 2-microglobulin. The relative fluorescence units were analyzed with the iQ5 software (Bio-Rad).

2.3.8 Statistic study

Unpaired Student's t-test was used to obtain statistical comparisons of the data. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

2.4 RESULTS

Mice were treated for 2 weeks with AICAR or metformin. Figure 2.1 and Table 2.2 show that both drugs increased the phosphorylated AMPK (pAMPK) levels of liver in average by 50.4%. AMPK is the main kinase regulator of ACC (Davis et al, 1992), therefore the protein levels of ACC and its phosphorylated form (pACC) were also analyzed. Both treatments increased the level of pACC, but AICAR induced a greater phosphorylation than metformin (increase of 163% for AICAR compare to 32% for metformin). Increased ACC phosphorylation suggests a lower hepatic fatty acid synthesis and consequently of TG. Thus, hepatic TG levels were determined. A 25% reduction in TG levels was observed in AICAR-treated mice (Figure 2.2A), but not with metformin. This may be related to the limited effect of metformin on ACC phosphorylation and inactivation. Interestingly, metformin has no significant effect on the total level of ACC, while AICAR increases it by more than 2-fold (Figure 2.1 and Table 2.2). This correlates with a higher level of SREBP-1c protein in liver from AICAR-treated mice (Figure 2.1 and Table 2.2), a known positive regulator of ACC gene expression (Dentin et al, 2004). Thus, the drugs have different effects on SREBP-1c that may very well be responsible for the different effects on ACC levels. Therefore, we uncovered two differences between these drugs, namely their impacts on SREBP-1c and ACC protein abundances. The level of HMG-CoA reductase was also analyzed. Figure 2.1 and Table 2.2 show that both drugs reduced its abundance. Accordingly, hepatic CHOL is reduced by approximately 20% by both treatments (Figure 2.2B).

Figure 2.2C shows that both drugs decreased blood CHOL by approximately 15% and more specifically HDL-CHOL by 20% (Figure 2.2C and D). As SR-BI level is negatively correlated with HDL-CHOL level, its level was estimated. Figure 2.3 and Table 2.3 show that both drugs reduced SR-BI protein levels by approximately half. Therefore, the fate of HDL protein and CE in control and AICAR treated mice was investigated in order to define if such reduction in SR-BI is indeed translated into HDL-CE SU. Figure 2.4 shows that HDL-CE clearance is reduced in AICAR-treated mice. HDL-protein clearance is also reduced but less than HDL-CE clearance. Accordingly, FCR analyses (Table 2.4) reveal that AICAR reduces by 39% the clearance of HDL-CE and by 20% that of HDL-

proteins, leading to a 48% reduction in HDL-CE SU activity. This reduction in HDL-CE SU can be explained by the lower level of SR-BI, however it cannot explain why HDL-CHOL level is lower in AICAR treated mice. Nevertheless efforts were devoted towards defining the cause of SR-BI protein level reduction. SR-BI protein abundance is known to correlate with that of its membrane adaptor protein PDZK1 (Kocher et al, 2003), but no difference in PDZK1 was detected (data not shown). However, the SR-BI mRNA levels were clearly diminished by approximately half (Table 2.4), suggesting that SR-BI reduction is at the transcriptional level. Interestingly, the levels of the splice variant SR-BII rose (Figure 2.3 and Table 2.3), while that of CD36 remained unchanged (data not shown), but none of these observations can explain the reduced level of HDL-CHOL.

To understand why AMPK activation decreases HDL-CHOL, attention was also given to the level of hepatic apoA-I and ABCA1, since HDL biogenesis and plasma levels can be influenced by the rate of apoA-I synthesis and its lipidation by ABCA1-mediated cholesterol efflux (Vaisman et al, 2001), the former being regulated by hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α (Chan et al, 1993). Interestingly, Figure 2.3 and Tables 2.3 and 2.5 show that AICAR treatment increases ABCA1 protein and mRNA levels in average by 68.3%, while metformin decreases ABCA1 protein levels by 33.2% without having a significant effect on ABCA1 mRNA. This suggests that AICAR treatment would enrich HDL in CHOL while metformin treatment would do the opposite, revealing another difference between the two drugs, but not explaining the overall reduction in HDL-CHOL by both drugs. However, Figure 2.3 and Table 2.3 show that both drugs reduced hepatic apoA-I protein abundances by 72.4% for AICAR and by 18.3% for metformin, which is correlated with a reduction of HNF-4 α . Overall, the mRNA levels parallel those of these two proteins (Table 2.5). Thus, it appears that the drugs decrease the transcription of HNF-4 α gene and that the lower levels of HNF-4 α protein reduces the transcription of apoA-I gene in the liver. In support of these findings, plasma HDL-apoA-I was also reduced by the two drugs, but AICAR treatment had stronger effect as it reduced apoA-I abundance by approximately 60% (Figure 2.2D). Thus hepatic apoA-I lower expression explains, at least in part, the lower levels of plasma HDL-CHOL and apoA-I detectable in drug-treated mice.

Differently, the drugs increased apoB-containing lipoprotein (VLDL + LDL)-CHOL by approximately 20% (Figure 2.2E). In mice, LDL-CHOL constitutes more than half of apoB containing lipoprotein-CHOL (Aubert, 1988). Thus it is likely that the effects of drugs are at least partially on LDL. The increase in plasma VLDL- or LDL-CHOL in treated mice cannot be explained by the lower levels of hepatic CHOL and HMG-CoA reductase, as those are positively linked to the synthesis and secretion of LDL precursors (VLDL) (Kang and Davies, 2000). Thus we looked for hepatic levels of receptors involved in LDL metabolism (LDLr, CD36 and SR-BI). Figure 2.3 and Table 2.3 show that neither drug has a significant effect on LDLr protein levels, which seemingly contradicts the positive effect of AICAR on LDLr mRNA abundance reported in hepatoma HepG2 cell line (Wang et al, 2008). Thus, the LDLr mRNA level was quantified. Table 2.4 shows that AICAR increases LDLr mRNA levels by approximately 50%, while metformin has no significant effect. Furthermore, Figure 2.3 and Table 2.3 indicate that hepatic SREBP-2 protein levels are higher in mice treated with either drug (in average by 33.8%), suggesting that LDLr mRNA and protein levels should indeed be higher. We found that PCSK9 protein levels were also increased in average by 31.0% by these drugs (Figure 2.3 and Table 2.3). Since PCSK9 is known to lead to lysosomal degradation of hepatic LDLr (Maxwell et al, 2005), its higher level may be responsible for the unchanged level of LDLr protein in spite of a higher mRNA abundance in mice treated with AICAR. Thus it is possible that lower SR-BI levels (Figure 2.3 and Table 2.3) and consequently lower SU activities towards LDL explain higher plasma LDL-CHOL in drug-treated mice.

2.5 DISCUSSION

This study was meant to thoroughly document and elucidate the *in vivo* effects of AMPK activation by metformin and AICAR in the mouse regarding the determinants of LDL- and HDL-CHOL and to search for any difference between the effects of the two drugs. Our study shows that both drugs increase AMPK phosphorylation, as suggested by the work of Kim et al, (2008) and Jørgensen et al, (2007), as well as of ACC, an AMPK phosphorylation target (Davies et al, 1992). Phosphorylation of ACC reduces its activity (Davies et al, 1992). Accordingly, hepatic TG levels were reduced in AICAR-treated mice. No difference was detectable in metformin-treated mice. This lack of apparent effect can be attributed to a lower level of phosphorylation of ACC by metformin. We also uncovered a difference between the drugs. Indeed, metformin has no significant effect on the total level of ACC, while AICAR increases it. The level of SREBP-1c paralleled that of ACC, a known positive regulator of ACC gene expression (Dentin et al, 2004). Thus, the drugs have different effects on SREBP-1c that are likely responsible for the different effects on ACC protein levels. It is possible that the drugs, at least at the doses used, affect differently the LXR-dependent SREBP-1c gene transcription (Yap et al, 2011). Alternatively, as high hepatic TG levels in metformin treated mice were found, it is possible that, even though AMPK activation reduces TG synthesis (Zenimaru et al., 2008), this drug may also act by enhancing TG uptake from cells, counterbalancing its primary effect. Other experiments will be required to fully understand this phenomenon. As expected, both drugs reduced the protein levels of HMG-CoA reductase and hepatic CHOL content with potential consequences on cholesterol metabolism.

It was shown that metformin lowers plasma LDL-CHOL in humans (Bolen et al, 2007 ; Salpeter et al, 2008) by a little more than 5%. Our work in mice shows that although total blood CHOL is significantly reduced by 15%, there is a 20% rise in apoB-containing lipoproteins-CHOL, thus most probably in LDL-CHOL; similar results were obtained with AICAR-treated mice. This apparent contradiction with observations in humans may relate to low level of LDL in mice compared to humans and/or increased synthesis of their precursors (VLDL), and/or lower receptors activities. Wang et al, (2008) showed that AICAR increases LDLr mRNA levels in HepG2 cells, but the team did not

determine the protein levels. Our results also show that AICAR raised LDLr mRNA levels, confirming their findings. However, metformin did not increase LDLr mRNA levels, revealing therefore another difference between the drugs. Because our results showed that both drugs increased the levels of SREBP-2, an increase in LDLr mRNA was expected in both cases. Thus, it is unclear why LDLr mRNA levels remained stable in the liver of metformin-treated mice. However, it is clear that neither drug changed significantly the hepatic LDLr protein abundance. Interestingly, our results showed higher PCSK9 protein levels, which may account for the unchanged levels of LDLr protein in spite of higher mRNA abundances in mice treated with AICAR. To our knowledge, this is the first time that an effect of AMPK activation on PCSK9 is reported. However, it is likely that it relates to the increase of SREBP-2 protein levels that we observed since Dong et al, (2010) demonstrated a strong induction of PCSK9 gene expression by SREBP-2.

We found that both drugs reduced the expression of SR-BI on a transcriptional level rather than through its regulation by the adaptor protein PDZK1. As reviewed in Leiva et al, (2011) there are many known up- and down-regulators of SR-BI gene transcription. Among the down-regulators, there is p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) (Murao et al, 2008). As stimulation of glucose transport by AMPK was reported to be linked to p38 MAPK (Xi et al, 2001), we propose that both drugs reduce SR-BI gene transcription through p38 MAPK signalling. Other experiments will be required to confirm this hypothesis. Nevertheless, the lower expression of SR-BI in drug-treated mice could explain their increased level of plasma VLDL- and LDL-CHOL due to lower CE-SU. Interestingly, we found higher levels of the splice variant SR-BII in drug-treated animals. The reason for this remains unknown, but it is not the first time that an antiparallel regulation is observed between the two forms. Indeed, it was reported that estrogens down-regulate SR-BI whilst up-regulating SR-BII (Zhang et al, 2007), a poor mediator of CE-SU. Since HDL-CHOL clearance (Table 2.4) is reduced with AICAR treatment, the SR-BII modulation did not compensate enough for the SR-BI down-regulation.

Although the lower expression of SR-BI generally results in increased plasma HDL-CHOL (Rigotti et al, 1997), the latter was 20% lower in metformin- and AICAR-treated mice. Therefore, the drugs seemingly acted more prominently on another metabolic pathway that may dictate blood HDL-CHOL. Though the reduced protein levels of ABCA1 in metformin-treated mice could partially explain the lower HDL-CHOL plasma levels, the upregulation of ABCA1 in AICAR-treated mice would rather call for higher plasma HDL-CHOL. Interestingly, we found that both drugs down-regulate HNF-4 α , as reported by Leclerc et al, (2001) in rat hepatocytes treated with AICAR; however, they have not observed lower expression of the *APOA1* gene (Chan et al, 1993) as we did in AICAR- and metformin-treated mice. The reasons for the discrepancies between their study and ours are not clear and may relate to species differences. Nevertheless, our study is to our knowledge the first one to describe the *in vivo* effect of AMPK activation on hepatic apoA-I levels. Usually, apoA-I expression correlates with apoA-I secretion and plasma HDL-CHOL (Sorci-Thomas et al, 1989), thus the effect of AMPK on apoA-I expression is a likely explanation for the lower levels of plasma HDL-CHOL and HDL-apoA-I in drug-treated mice.

Overall, our work suggests that both metformin and AICAR have similar effects on apoB-containing lipoproteins- and HDL-CHOL in mice, increasing the former by reducing SR-BI expression level and the latter by lowering that of apoA-I. Again this effect is different from those observed by Bolen et al, (2007) and Salpeter et al, (2008) when analyzing the long term effects of metformin medication in T2D subjects. The differences may be species- or diabetes-dependent as we used non-diabetic mice and moreover, mice have naturally low levels of LDL as opposed to humans. This study also revealed that the two drugs have similar effects on various lipid and lipoprotein determinants, but that they differ by their actions on hepatic TG, ACC, SREBP-1c and ABCA1 protein levels and on LDLr mRNA levels. Figure 2.5 summarizes the effects of both drugs in mouse hepatic cells. More importantly this study is the first one addressing in an exhaustive way the effects of AMPK activation on elements that are related to lipoprotein-CHOL levels.

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The technical support of Louise Falstrault is acknowledged.

Sources of funding

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada.

Disclosures

None relevant to this study

2.7 REFERENCES

- Acton, S., A. Rigotti, K. T. Landschulz, S. Xu, H. H. Hobbs, and M. Krieger. 1996. Identification of scavenger receptor SR-B1 as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271: 518-520.
- Asztalos, B. F., M. de la Llera-Moya, G. E. Dallai, K. V. Horvath, E. J. Schaefer, and G. H. Rothblat. 2005. Differential effects of HDL subpopulations on cellular ABCA1- and SR-BI-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 46: 2246-2253.
- Aubert, R., M. C. Camus, F. Bourgeois, J. Herzog, and D. Lemonnier. 1988. Serum lipoprotein profiles in mice: effects of early over- and undernutrition. *J Nutr.* 118: 1190-1196.
- Bolen, S., L. Feldman, J. Vassy, L. Wilson, H. C. Yeh, S. Marinopoulos, C. Wiley, E. Selvin, R. Wilson, E. B. Bass and F. L. Brancati. 2007. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 147: 386-399.
- Brewer, H. B. Jr, D. L. Sprecher, R. E. Gregg, and J. M. Hoeg. 1985. Risk factors for the development of premature cardiovascular disease. *Adv Exp Med Biol.* 183: 27-36.
- Brissette, L., M.-C. Charest, and L. Falstrault. 1996. Selective uptake of cholesteryl esters of low-density lipoproteins is mediated by the lipoprotein-binding site in HepG2 cells and is followed by the hydrolysis of cholesteryl esters. *Biochem J.* 318: 841-847.
- Brodeur, M. R., V. Luangrath, G. Bourret, L. Falstrault, and L. Brissette, L. 2005. Physiological importance of SR-BI in the in vivo metabolism of human HDL and LDL in male and female mice. *J Lipid Res.* 46: 687-696.
- Chan, J., H. Nakabayashi, and N. C. Wong. 1993. HNF-4 increases activity of the rat Apo A1 gene. *Nucleic Acids Res.* 21: 1205-1211.
- Corton, J. M., J. G. Gillespie, S. A. Hawley, and D. G. Hardie. 1995. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem.* 229: 558-565.
- Davies, S. P., D. Carling, M. R. Munday, and D. G. Hardie, 1992. Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets. *Eur J Biochem.* 203: 615-623.
- Dentin, R., J. P. Pégorier, F. Benhamed, F. Fougelle, P. Ferré, V. Fauveau, M. A. Magnuson, J. Girard, and C. Postic. 2004. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem.* 279: 20314-20326.

Dong, B., M. Wu, H. Li, F. B. Kraemer, K. Adeli, N. G. Seidah, S. W. Park, and J. Liu. 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.

Eckhardt, E. R., L. Cai, B. Sun, N. R. Webb, and D. R. van der Westhuyzen. 2004. High density lipoprotein uptake by scavenger receptor SR-BII. *J Biol Chem.* 279: 14372-14381.

Fabre, A. C., C. Malaval, A. Ben Addi, C. Verdier, V. Pons, N. Serhan, L. Lichtenstein, G. Combes, T. Huby, F. Briand, X. Collet, N. Nijstad, U. J. Tietge, B. Robaye, B. Perret, J. M. Boeynaems, and L. O. Martinez, 2010. P2Y13 receptor is critical for reverse cholesterol transport. *Hepatology* 52: 1477-1483.

Fisher, E. A., J. E. Feig, B. Hewing, S. L. Hazen, and J. D. Smith. 2012. High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32: 2813-2820.

Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane-Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226: 497-509.

Goldstein, J. L., and M.S. Brown. 1974. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 249: 5153-5162.

Hatch, F. T., and R. S. Lees. 1968. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv Lipid Res.* 6: 1-68.

Hawley, S. A, J. Boudeau, J. L. Reid, K. J. Mustard, L. Udd, T. P. Mäkelä, D. R. Alessi and D. G. Hardie. 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol.* 2: 28.

Heijboer, A.C., E. Donga, P. J. Voshol, Z. C. Dang, L. M. Havekes, J. A. Romijn, and E. P. Corssmit. 2005. Sixteen hours of fasting differentially affects hepatic and muscle insulin sensitivity in mice. *J Lipid Res.* 46: 582-588.

Henin, N., M. F. Vincent, H. E. Gruber, and G. Van den Berghe. 1995. Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *FASEB J.* 9:541-546.

Hong, Y. H., U. S. Varanasi, W. Yang, and T. Leff. 2003. AMP-activated protein kinase regulates HNF4 transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *J Biol Chem.* 278: 27495-27501.

Jørgensen, S. B., J. T. Treebak, B. Viollet, P. Schjerling, S., Vaulont, J. F. Wojtaszewski, and E. A. Richter. 2007. Role of AMPK α 2 in basal, training-, and AICAR-induced GLUT4, hexokinase II, and mitochondrial protein expression in mouse muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292: E331-339.

Kang, S., and R. A. Davis. 2000. Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion. *Biochim Biophys Acta.* 1529: 223-230.

Kim, Y. D., K.-G. Park, Y.-S., Lee, Y.-Y. Park, D.-K. Kim, B. Nedumaran, W. G. Jang, W.-J. Cho, J. Ha, I.-K. Lee, C.-H. Lee, and H.-S. Choi. 2008. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes* 57: 306-314.

Kocher, O., A. Yesilaltay, C. Cirovic, R. Pal, A. Rigotti, and M. Krieger. 2003. Targeted disruption of the PDZK1 gene in mice causes tissue-specific depletion of the high density lipoprotein receptor scavenger receptor class B type I and altered lipoprotein metabolism. *J Biol Chem.* 278: 52820-52825.

Leclerc, I., C. Lenzner, L. Gourdon, S. Vaulont, A. Kahn, and B. Viollet. 2001. Hepatocyte nuclear factor-4 α involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 50: 1515-1521.

Lee, J. O., S. K. Lee, J. H. Jung, J. H. Kim, G. Y. You, S. J. Kim, S. H. Park, K. O. Uhm, and H. S. Kim. 2011. Metformin induces Rab4 through AMPK and modulates GLUT4 translocation in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol.* 226: 974-981.

Leiva, A., H. Verdejo, M. L. Benítez, A. Martínez, D. Busso, A., and Rigotti. 2011. Mechanisms regulating hepatic SR-BI expression and their impact on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 217: 299-307.

Luangrath, V., M. R. Brodeur, D. Rhainds, and L. Brissette. 2008. Mouse CD36 has opposite effects on LDL and oxidized LDL metabolism in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28: 1290-1295.

Martinez, L. O., S. Jacquet, J. P. Esteve, C. Rolland, E. Cabezón, E. Champagne, T. Pineau, V. Georgeaud, J. E. Walker, F. Tercé, X. Collet, B. Perret, and R. Barbaras. 2003. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 421: 75-79.

Matthews, M. E. 1957. The theory of tracer experiments with ^3H -labelled plasma proteins. *Physiol Med Biol.* 2: 36-53.

Maxwell, K. N., E. A. Fisher, and J. L. Breslow. 2005. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc Natl Acad Sci. USA,* 102: 2069-2074.

McFarlane, A.S. 1948. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* 182: 53-54.

Murao, K., X. Yu, H. Imachi, W.M. Cao, K. Chen, K. Matsumoto, T. Nishiuchi, N. C. Wong, and T. Ishida. 2008. Hyperglycemia suppresses hepatic scavenger receptor class B type I expression. *Am J Physiol.* 294: E78-87.

Owen, M. R., E. Doran, and A. P. Halestrap. 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 348: 607-614.

Rhinds, D., M. Brodeur, J. Lapointe, D. Charpentier, L. Falstrault, and L. Brisette. 2003. The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters. *Biochemistry* 42: 7527-7538.

Rigotti, A., B. L. Trigatti, M. Penman, H. Rayburn, J. Herz, and M. Krieger. 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 12610-12615.

Roberts, D. C., N. E. Miller, S. G. Price, D. Crook, C. Cortese, A. La Ville, L. Masana, and B. Lewis. 1985. An alternative procedure for incorporating radiolabelled cholesteryl ester into human plasma lipoproteins in vitro. *Biochem J.* 226: 319-322.

Salpeter, S. R., Buckley, N. S., Kahn, J. A., and Salpeter, E. E. 2008. Meta-analysis: metformin treatment in persons at risk for diabetes mellitus. *Am J Med.* 121: 149-157.

Santamarina-Fojo. 2001. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest.* 108: 303-309.

Shimomura, I., H. Shimano, J. D. Horton, J. L. Goldstein, and M. S. Brown. 1997. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest.* 99: 838-845.

Sorci-Thomas, M., M. M. Prack, N. Dashti, F. Johnson, L. L. Rudel, and D. L. Williams. 1989. Differential effects of dietary fat on the tissue-specific expression of the apolipoprotein A-I gene: relationship to plasma concentration of high density lipoproteins. *J Lipid Res.* 30: 1397-1403.

Spencer-Jones, N. J., D. Ge, H. Snieder, U. Perks, R. Swaminathan, T. D. Spector, N. D. Carter, and S. D. O'Dell. 2006. AMP-kinase alpha2 subunit gene PRKAA2 variants are associated with total cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol and high-density lipoprotein-cholesterol in normal women. *J Med Genet.* 43: 936-942.

Vaisman, B. L., G. Lambert, M. Amar, C. Joyce, T. Ito, R. D. Shamburek, W. J. Cain, J. Fruchart-Najib, E. D. Neufeld, A. T. Remaley, H. B. Jr. Brewer, and S. Santamarina-Fojo. 2001. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest.* 108: 303-309.

Wang, D. S., J. W. Jonker, Y. Kato, H. Kusuhara, A. H. Schinkel, and Sugiyama, Y. 2002. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther.* 302: 510-515.

Wang, H. M., S. Mehta, R. Bansode, W. Huang, and K. D. Mehta. 2008. AICAR positively regulate glycogen synthase activity and LDL receptor expression through Raf-1/MEK/p42/44MAPK/p90RSK/GSK-3 signaling cascade. *Biochem Pharmacol.* 75: 457-467.

Woods, A., S. R. Johnstone, K. Dickerson, F. C. Leiper, L. G. Fryer, D. Neumann, U. Schlattner, T. Wallimann, M. Carlson, D. Carling, A. Woods, S. R. Johnstone, K. Dickerson, F. C. Leiper, L. G. Fryer, D. Neumann, U. Schlattner, T. Wallimann, M. Carlson, and D. Carling. 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol.* 13: 2004-2008.

Xi, X., J. Han, and J. Z. Zhang. 2001. Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 276: 41029-41034.

Yap, F., L. Craddock, and J. Yang. 2011. Mechanism of AMPK suppression of LXR-dependent *Srebp-1c* transcription. *Int J Biol Sci.* 7: 645-650.

Zenimaru, Y., Takahashi, S., Takahashi, M., Yamada, K., Iwasaki, T., Hattori, H., Imagawa, M., Ueno, M., Suzuki, J., Miyamori, I. 2008. Glucose deprivation accelerates VLDL receptor-mediated TG-rich lipoprotein uptake by AMPK activation in skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 368: 716-722.

Zhang, X., A. N. Moor, K. A. Merkler, Q. Liu, and M. P. 2007. Regulation of alternative splicing of liver scavenger receptor class B gene by estrogen and the involved regulatory splicing factors. *Endocrinology* 148: 5295-5304.

Zhou, G., R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. Fenyk-Melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doebber, N. Fujii, N. Musi, M. F. Hirshman, L. J. Goodyear, and D. E. Moller. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 108: 1167-1174.

2.8 FIGURE AND LEGENDS

Figure 2.1: Protein levels of pAMPK, ACC, pACC, SREBP-1c and HMG-CoA red in the liver of control and metformin- or AICAR-treated mice.

Mice were treated, livers were collected and their proteins were subjected to SDS-PAGE, Western blotting and immunodetection as described in the Materials and method section. Results are representative of a minimum of 3 mice for each treatment and the experiments were conducted at least in duplicates.

Figure 2.2: Hepatic CHOL and TG levels and blood total CHOL, LDL-CHOL, HDL-CHOL and apoA-I levels of control and metformin- or AICAR-treated mice.

Mice were treated and their livers were collected and subjected to triglyceride (A) and cholesterol (B) determinations as described in the Materials and method section. Also blood was collected for cholesterol (C), LDL-cholesterol (D) and apoA-I (E) measurements as described in Materials and method section. Values are mean \pm SEM from 3-6 mice per group. Measurements were done minimally in triplicates. *statistically different ($p < 0.05$), **statistically different ($p < 0.005$) and ***statistically different ($p < 0.0005$) from control mice.

Figure 2.3: Protein levels of SR-BI, SR-BII, apoA-I, HNF-4 α , ABCA1, LDLr, SREBP-2 and PCSK9 in the liver of control and metformin- or AICAR-treated mice.

Mice were treated, livers were collected and their proteins were subjected to SDS-PAGE, Western blotting and immunodetection as described in the Materials and method section. Results are representative of 3 mice for each treatment and the experiments were conducted at least in duplicates.

Figure 2.4: Turnover studies of ^3H -CE- and ^{125}I -HDL in control and AICAR-treated mice.

A bolus of 480 μg of human non-radiolabelled HDL₃ and 20 μg of HDL₃ radiolabelled with either ^{125}I or ^3H -CE was injected into the tail vein of control or AICAR-treated mice. At the indicated times, blood samples were collected and the radioactivity remained in the plasma was determined as described in the Materials and methods section. Each point represents the mean \pm SEM of a minimum of 3 mice.

Figure 2.5: Summary of the effects of metformin and AICAR on hepatic lipid and plasma lipoprotein determinants.

The direction of the arrows corresponds to decrease or increase, while “~” indicates no significant effect. The effects of metformin are depicted in gray, while those of AICAR are in black.

Table 2.1 Forward and reverse primers for qPCR

| | Primers | |
|--|----------------------------------|----------------------------------|
| | Forward | Reverse |
| β2 microglobulin | 5'-TACTCACGCCACCCACCGGAG-3' | 5'-GCTCGGCCATACTGGCATGCT-3' |
| LDLr | 5'-AGCCTGACAAGTCGCATGGCTC-3' | 5'-AAAAGCACGCTGGCCCATGGTG-3' |
| SR-BI | 5'-TGAAGGTGGTCTTCAAGAGCAGTCCT-3' | 5'-GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGC-3' |
| ABCA1 | 5'-GGGCATGTGGGAAGAACTCA-3' | 5'-TGGATTGCCTGGTTGGTCTC-3' |
| ApoA-I | 5'-GGTCAAAGACAGCGGCAGAG-3' | 5'-CCAGAGTGTCACAGTTTCCA-3' |
| HNF-4α | 5'-GCAAGGGGTTCTTCAGGAGG-3' | 5'-TGCTGTCCTCGTAGCTTGCA-3' |

Table 2.2 Protein levels of pAMPK, ACC, pACC, SREBP-1c and HMG-CoA red in the liver of control and metformin- or AICAR-treated mice

| Protein level | Metformin (Met) (% of control \pm SEM) | AICAR (% of control \pm SEM) |
|----------------------|--|--|
| pAMPK | 138.9 \pm 13.6 (6) * | 161.3 \pm 16.9 (6) * |
| pACC | 132.0 \pm 9.9 (3) * | 263.0 \pm 70.3 (3) ** |
| ACC | 100.1 \pm 4.8 (6) | 229.9 \pm 14.5 (3) ** |
| SREBP-1c | 50.5 \pm 16.1 (6) * | 123.2 \pm 4.8 (6) * |
| HMG-CoA red. | 54.5 \pm 5.6 (3) * | 32.1 \pm 13.9 (3) * |

Mice were treated, livers were collected and their proteins were subjected to SDS-PAGE, Western blotting, immunodetection and quantification as described in the Materials and method section. Results are % of control \pm SEM of the number of mice indicated between parentheses. *Statistically different ($p < 0.05$) and **Statistically different ($p < 0.005$) from control mice.

Table 2.3 Protein levels of LDLr, SREBP-2, PCSK9, SR-BI, SR-BII, apoA-I, HNF-4 α and ABCA1 in the liver of control and metformin- or AICAR-treated mice

| Protein level | Metformin (Met) (% of control \pm SEM) | AICAR (% of control \pm SEM) |
|----------------------------------|--|--|
| SR-BI | 53.9 \pm 10.6 (3) * | 49.7 \pm 3.9 (3) * |
| SR-BII | 166.2 \pm 15.9 (3) * | 178.5 \pm 35.9 (3) * |
| ApoA-I | 81.7 \pm 6.6 (3) * | 27.6 \pm 7.2 (6) *** |
| HNF-4 α | 66.2 \pm 6.1 (6) * | 72.9 \pm 5.4 (3) * |
| ABCA1 | 67.8 \pm 10.2 (6) * | 160.0 \pm 22.1 (6) * |
| LDLr | 110.0 \pm 8.5 (6) | 105.0 \pm 7.5 (6) |
| SREBP-2 | 141.8 \pm 10.3 (6) * | 125.8 \pm 8.9 (3) * |
| PCSK9 | 140.3 \pm 11.4 (6) * | 121.6 \pm 7.5 (6) * |

Mice were treated, livers were collected and their proteins were subjected to SDS-PAGE, Western blotting, immunodetection and quantification as described in the Materials and method section. Results are % of control \pm SEM of the number of mice indicated between parentheses. *statistically different ($p < 0.05$) and ***Statistically different ($p < 0.0005$) from control mice.

Table 2.4 Fractional catabolic rates for ^{125}I - and ^3H -CE-labelled HDL₃ from plasma of control and AICAR-treated mice

| | ^3H -CE-HDL ₃ | ^{125}I -HDL ₃ | $^3\text{H} - ^{125}\text{I}$ |
|----------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| Control | 0.306 ± 0.034 (4) | 0.097 ± 0.005 (4) | 0.201 |
| AICAR | 0.187 ± 0.035 (3) * | 0.080 ± 0.001 (5) ** | 0.107 |

Control and AICAR-treated mice were injected via the tail vein with a bolus of human HDL₃ (480 µg non-radiolabeled HDL₃ and 20 µg HDL₃ radiolabeled with either ^{125}I or ^3H -CE). Blood samples were taken at selected intervals and counted for radioactivity as described in the Material and Methods section. The FCR were calculated using a two-compartment model and are expressed as pools/h. All values are given as mean ± SEM of the number of mice indicated in parenthesis. *Statistically different (p<0.05) and **Statistically different (p<0.005) from FCR of control mice.

Table 2.5 Hepatic LDLr, SR-BI, ABCA1, apoA-I and HNF-4 α mRNA levels in control and metformin- or AICAR-treated mice.

| mRNA level | Metformin (Met) (% of control \pm SEM) | AICAR (% of control \pm SEM) |
|---------------------------------|--|--|
| LDLr | 94.9 \pm 10.7 (6) | 151.9 \pm 7.4 (6) ** |
| SR-BI | 46.5 \pm 4.3 (4) * | 55.8 \pm 5.9 (4) * |
| ABCA1 | 133.3 \pm 13.6 (6) | 176.5 \pm 26.0 (5) * |
| ApoA-I | 85.5 \pm 5.9 (6) * | 60.0 \pm 5.3 (6) * |
| HNF-4α | 54.6 \pm 13.7 (5) * | 66.1 \pm 7.2 (6) * |

Liver total RNA from control and metformin or AICAR treated mice was extracted, reversed transcribed and qPCR was performed as described in the Materials and method section. Results are % of control \pm SEM of the number of mice indicated between parentheses. *Statistically different ($p < 0.05$) and **Statistically different ($p < 0.005$) from control mice.

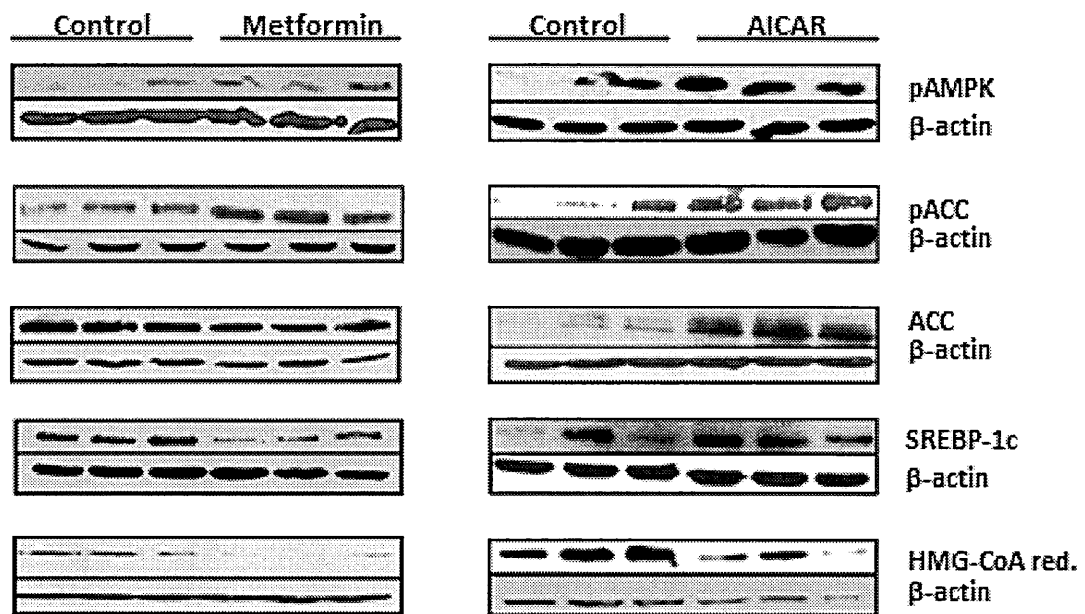


Figure 2.1 Protein levels of pAMPK, ACC, pACC, SREBP-1c and HMG-CoA red in the liver of control and metformin- or AICAR-treated mice

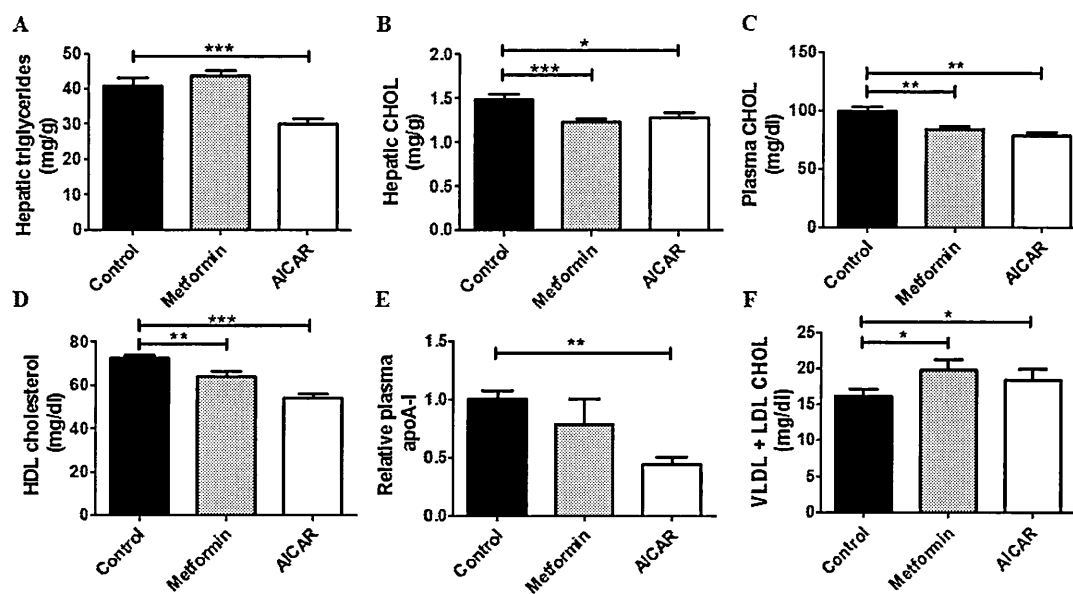


Figure 2.2 Hepatic CHOL and TG levels and blood total CHOL, LDL-CHOL, HDL-CHOL and apoA-I levels of control and metformin- or AICAR-treated mice

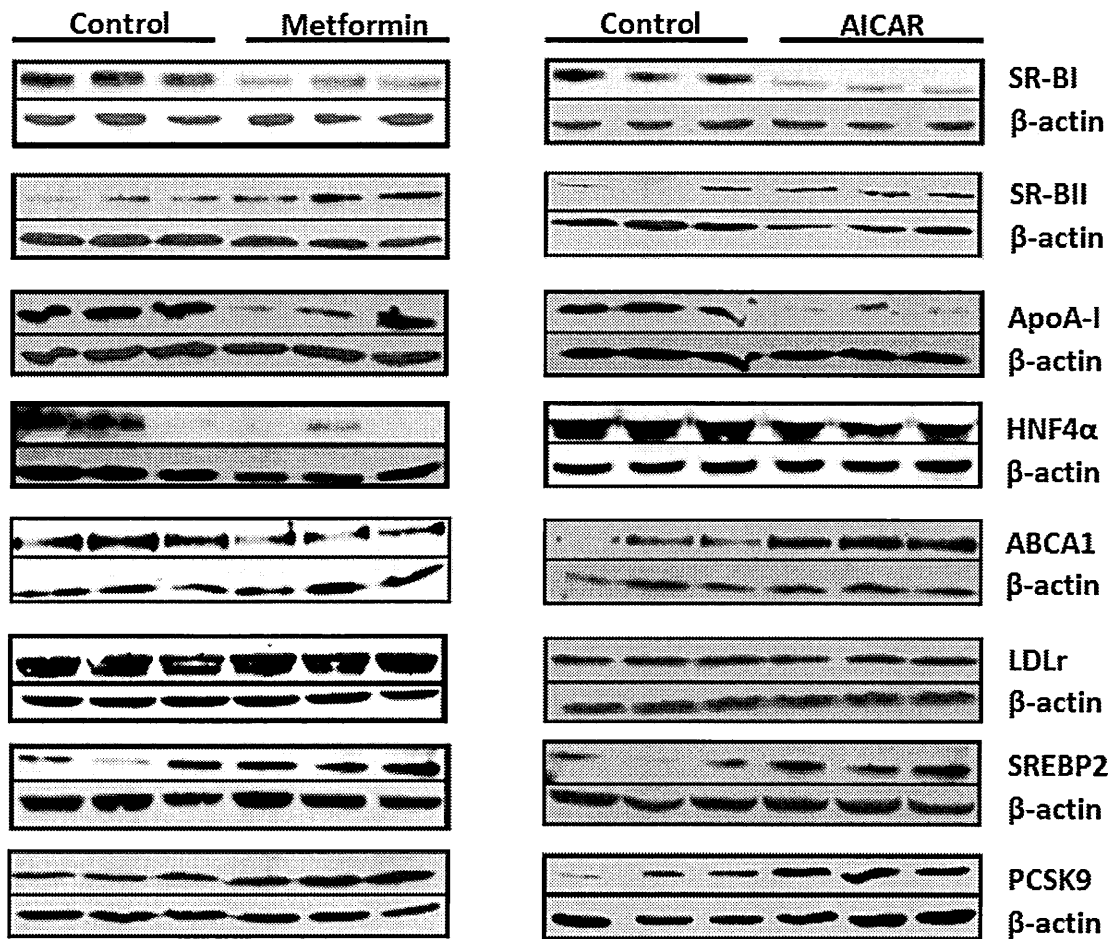


Figure 2.3 Protein levels of SR-BI, SR-BII, apoA-I, HNF-4 α , ABCA1, LDLr, SREBP-2 and PCSK9, in the liver of control and metformin- or AICAR-treated mice

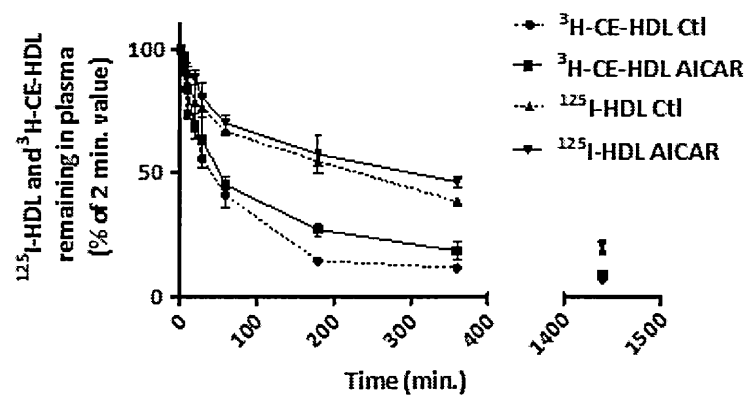


Figure 2.4 Turnover studies of ^3H -CE- and ^{125}I -HDL in control and AICAR-treated mice.

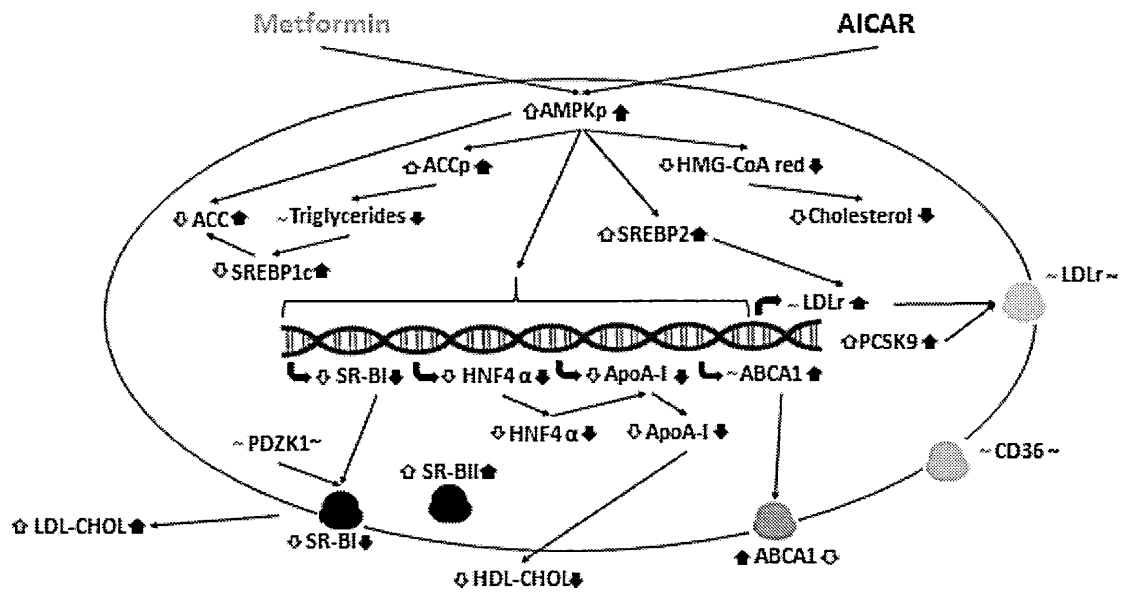


Figure 2.5 Summary of the effects of metformin and AICAR on hepatic lipid and plasma lipoprotein determinants

CHAPITRE III

EFFECT OF METFORMIN AND AICAR ON DETERMINANTS OF LIPOPROTEIN METABOLISM IN HUMAN HEPG2 HEPATOMA CELLS

^{1,3}François Dallaire, ²David Rhainds, ¹Jade Desjardins and ¹Louise Brissette*

¹Laboratoire du métabolisme des lipoprotéines, Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Qc, Canada, H3C 3P8

²Groupe de recherches sur l'athérosclérose, Institut de Cardiologie de Montréal, Montréal, Qc, Canada, H1T 1C8

³Present adress : Institut de Cardiologie de Montréal, Montréal, Qc, Canada, H1T 1C8

Running title: Effects of AMPK activation on HepG2 cells

*To whom correspondence should be addressed:

Louise Brissette, Ph.D.

Professor

Département des sciences biologiques

Université du Québec à Montréal

CP 8888, succ. Centre-Ville

Montréal (Québec)

Canada H3C 3P8

E-mail: brissette.louise@uqam.ca

Répartition du travail pour le deuxième manuscrit

La répartition du travail sur le deuxième article reflète aussi l'ordre des auteurs. En tant que premier auteur, j'ai réalisé la vaste majorité des expériences, élaboré toutes les figures et participé très activement à la rédaction du papier. David Rhains, quant à lui, a participé à l'élaboration du projet, l'écriture du papier et à la totalité des expériences des tableaux 3.2 et 3.3. Jade Desjardins fut une aide technique constante tout au long du projet. Finalement, la Dre Louise Brissette est la professeure chercheuse qui a élaboré, supervisé et financé le projet, tout en participant à la rédaction du papier. Note : Louise Falstrault a effectué le test MTT présent sur la figure 3.2.

3.1 SUMMARY

The AMP-activated protein kinase (AMPK) is an enzyme that plays a key role in energy metabolism. Many studies suggest a relation between AMPK activity and lipoprotein metabolism. The aim of our study was to determine the effects of AMPK activation on hepatic lipoprotein metabolism in human HepG2 cells in relation with the low density lipoprotein (LDL) receptor (LDLr) which dictates LDL particle metabolism by its capture followed by its complete degradation, and with the scavenger receptor class B, type I (SR-BI) that is responsible for selective uptake (SU) of cholesteryl esters (CE) from LDL and HDL. Briefly, treatments with metformin and 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR), two AMPK activators, increased LDLr mRNA and protein after 24 hours. Accordingly, LDL degradation increased by 59%. Differently both drugs decreased SR-BI protein expression by 54% and 68% after 6 and 24 hours with metformin treatments and by 62% after 24 hours with AICAR treatments. The lower expression of SR-BI cannot explain the observed rise in CE-SU from both lipoproteins. However, we showed that both drugs increase the cell surface expression of SR-BI by 93% as well as the total level of cluster of differentiation 36 (CD36), another receptor capable of SU toward HDL and LDL. Both results can explain the rise in SU activity. Finally, AICAR and metformin reduced the apoA-I level but by a different mechanism as metformin reduces apoA-I level through transcriptional regulation, while AICAR enhanced its degradation. Modification on LDLr and SR-BI synthesis and activity could have important results on reverse cholesterol transport *in vivo*, while apoA-I reduction could reduce the HDL biogenesis.

3.2 INTRODUCTION

In North America, cardiovascular diseases (CV) are the first cause of death among the population. Atherosclerosis is the most common of those sicknesses. Lipoproteins, small transporters of cholesterol and triglycerides (TG), are among the main factors influencing atherosclerosis (Brown et al, 1974). Low density lipoproteins (LDL) are known to be positively correlated with an increased risk of developing atherosclerosis (Brewer et al, 1985). When oxidized, LDL (LDL_{ox}) cause direct damage to the arterial wall increasing inflammation response and atherosclerosis risk (Steinberg et al, 1997). To the contrary, high density lipoproteins (HDL) negatively correlate with CV risk, since they have the ability to bring exceeding cholesterol from peripheral cells back to liver for its excretion, a process named reverse cholesterol transport (reviewed in Fisher et al, 2012).

Many factors can modify the lipoprotein blood level profile. Among them receptor activity plays a major role in lipoprotein levels. The LDL receptor (LDLr) operates by capturing the LDL, followed by its endocytosis. The LDL is then degraded by lysosomal hydrolases, while the LDLr is most of the times recycled to the cell membrane (Brown and Goldstein, 1986), unless proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), a plasmatic protein known to interact with LDLr at the cell surface, causes its internalization and lysosomal degradation (Maxwell et al, 2004-2005). As a result, high levels of PCSK9 lower LDLr and consequently increase blood LDL level (Ni et al, 2010). The scavenger receptor class B, type I (SR-BI), is also known to interact with lipoproteins but in a different manner (Acton et al, 1996). This receptor selectively takes up cholesteryl ester (CE) from the lipoprotein core, releasing a lipoprotein depleted in CE in blood circulation. Our laboratory has shown that SR-BI is capable of CE selective uptake (SU) from LDL (Rhainds et al, 2003; Brodeur et al, 2005). We also showed that in absence of SR-BI, the cluster of differentiation-36 (CD36) is able of SU activity towards LDL (Luangrath et al, 2008). The ability of SR-BI to selectively take up CE from HDL has been demonstrated much earlier (Acton et al, 1996).

HDL biogenesis can be influenced by the apolipoprotein A-I (apoA-I) synthesis and metabolism (reviewed in Rye and Barter, 2014). Hepatocytes synthesize and secrete lipid

free apoA-I into plasma. ATP-binding cassette transporter member 1 (ABCA1) will then charge this apoA-I with lipid to form a discoidal HDL (Smith et al, 2004). A second lipid charge will occur through the ATP-binding cassette sub-family G member 1 (ABCG1) as well as from lipid exchanges between other classes or subclasses of lipoproteins to form mature HDL (reviewed by Rye et al, 1999 ; Wang et al, 2004).

AMPK is a key enzyme regulating cellular energetic metabolism. Its activation occurs after a decrease in the ATP/AMP ratio following energy consumption. A high AMP level allows AMP binding to AMPK and a conformational change promoting its phosphorylation by the tumor suppressor liver kinase B1 (LKB1) (Woods et al, 2003). When activated, AMPK inhibits anabolic pathways in favor of catabolic pathways in the liver to restore the ATP/AMP ratio (Grossman et al, 2006). AMPK mainly acts by phosphorylating acetyl-CoA carboxylase (ACC) causing its inhibition which leads to TG synthesis reduction (Davies et al, 1992). It also inhibits hydroxyl-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase, a limiting enzyme in cholesterol synthesis (Oliaro-Bosso et al, 2009). Recently, studies have correlated AMPK activation with changes in lipoprotein-lipid levels (Spencer-Jones et al, 2006; Foretz et al, 2006). Our main objective was to define the effects of AMPK activation on lipoprotein metabolism in HepG2 cells and more precisely on SR-BI and LDLr levels and cholesterol uptake from LDL and HDL.

Importantly, we found that metformin and 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR), two AMPK activators, increased LDLr level and reduced SR-BI expression in HepG2 cells. Surprisingly, the CE-SU from LDL and HDL did not correlate with SR-BI reduction. That phenomenon is correlated by an increase of the level of SR-BI at the cell surface plasma membrane and by an enhanced CD36 expression. Interestingly, we also found that AMPK activation could influence HDL biogenesis through the reduction of apoA-I protein level.

3.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES

3.3.1 Materials

The human hepatoma cell line HepG2 was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Human normolipidemic plasma came from Bioreclamation (New York, USA). Fetal Clone I was from Hyclone Laboratories (Logan, UT, USA). Glutamin, trypsin, penicillin-streptomycin and Trizol were purchased from Invitrogen Life Technologies (Burlington, Ontario). 1,2-³H]-cholesteryl oleate (50 mCi/mmol) was bought from Amersham Pharmacia Biotech (Laval, Quebec, Canada) and ¹²⁵Iodine (as sodium iodide, 100 mCi/mmol) was bought from ICN Canada (Montreal, Quebec). Anti-PCSK9, anti-SR-BI and anti-rabbit IgG AlexaFluor 488 were from Abcam (Toronto, Ontario, Canada), anti-apoA-I, anti-LDLr, anti-CD36 from Novus Biologicals (Oakville, Ontario, Canada), anti-β-actin, anti-rabbit IgG from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, U.S.A.), anti-phospho-AMPK (Thr172) from Biolabs (Hitchin, Hertfordshire, United Kingdom), anti-AMPK from Biorbyt (San Francisco, California, U.S.A.) and anti-mouse IgG from GE (Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). Human apoA-I Elisa kit was purchased from Abcam (Toronto, Ontario, Canada). Enzymatic kit for CHOL came from Wako Chemicals (Richmond, Virginia, U.S.A.) and TG kit from Sigma-Aldrich (St-Louis, Missouri, USA). AICAR was obtained from Toronto Research Chemical Inc. (Toronto, Ontario, Canada), while metformin, compound C and MG132 were from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA). Reverse transcription kit came from Biobasics (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). The iCycler IQ detection system was used for qPCR with SYBRgreen from BioRad (Hercules, California, U.S.A.). Lastly, Hoechst and Cellmask came from Life Technologies (Carlsbad, California, U.S.A.).

3.3.2 HepG2 cell culture and treatments

HepG2 cells were grown in 6-well plates containing Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 Units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 4 mM glutamine. Prior to investigation, cells were brought to 80% confluence and treated for 24 hours. For qPCR and immunoblotting, cells were

treated with AICAR (1 mM) or metformin (2 mM) for 5, 15 minutes and 1, 6, 24 hours and 1, 6 and 24 hours for ELISA assay. To analyze the effect of AMPK activation on proteasome activity, cells were treated with AICAR (1 mM) for 24 hours alone or combined with MG132 (1 μ M) for 25 hours.

3.3.3 Preparation and labelling of lipoproteins

Human normolipidemic plasma was supplemented with 0.01% ethylenediamine tetraacetate (EDTA), 0.02% sodium azide, 10 μ M phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 10 μ M Trolox before the isolation of lipoproteins, which was achieved by ultracentrifugation as described in Hatch and Lees (1968). Human LDL (density=1.025-1.063 g/ml) and HDL₃ (density 1.125-1.21 g/ml) were prepared as described by Brissette et al. (2003). LDL and HDL₃ were iodinated by a modification (Langer et al, 1972) of the iodine monochloride method of McFarlane (1948). One mCi of sodium ¹²⁵iodide was used to iodinate 2.5 mg of LDL or HDL₃ in the presence of 30 nmoles (10 nmoles for HDL₃) of iodine monochloride in 0.5 M glycine-NaOH, pH 10. Free iodine was removed by gel filtration on Sephadex G-25 followed by dialysis in Tris-buffered saline (TBS). The specific radioactivity ranged from 100,000 to 250,000 cpm/ μ g protein. LDL and HDL₃ were labelled with [³H]-cholesteryl oleate (CE) as described by Roberts et al, (1985). Thereafter, the labelled lipoproteins were re-isolated by ultracentrifugation. The specific activity of labelled lipoproteins ranged from 6800 to 11,900 cpm/ μ g protein.

3.3.4 Lipoprotein cell association and degradation assays

HepG2 cells were washed twice with PBS and were incubated for 3 hours at 37°C with 20 μ g protein/ml of [¹²⁵I]lipoprotein or [³H]CE-lipoprotein (LDL or HDL₃) in a total volume of 250 μ l containing 125 μ l of MEM (2 \times) plus 4% bovine serum albumin (MEM-BSA), pH 7.4 (total association). After incubation, the cells were washed twice with PBS plus 0.2% BSA (PBS-BSA) followed by one wash with 1 ml of PBS. Cells incubated with ¹²⁵I-lipoprotein were then homogenized in 0.2 N NaOH. Radioactivity in the homogenates was measured with a Cobra II counter (Canberra-Packard) and cell protein content was estimated. The specific association was calculated by subtracting the non-specific association of ¹²⁵I-lipoprotein, as determined by the addition of 2 mg protein/ml

of unlabelled ligand, from the total association. [³H]CE-lipoprotein association (20 µg/ml) was determined by *in situ* delipidation of cell monolayers with hexane/isopropanol 3:2 (v/v). Associated [³H]-CE mass was measured by liquid scintillation counting (Wallack Beta Counter). [³H]-CE-lipoprotein association was also estimated as µg lipoprotein protein/mg cell protein (apparent uptake). To achieve this, the specific activity of [³H]-CE-lipoprotein was calculated in cpm/µg lipoprotein protein. [³H]-CE association due to selective uptake was calculated as the total [³H]-CE association minus (¹²⁵I-protein association + ¹²⁵I-protein degradation). To measure ¹²⁵I-lipoprotein degradation, trichloroacetic acid (TCA) was used at a final concentration of 12% and degradation was estimated from the incubation medium as the non-iodine TCA-soluble fraction.

3.3.5 mRNA quantification

Cell total RNA was extracted using Trizol following the manufacturer's instructions. One microgram of RNA was reverse transcribed and qPCR was achieved using the iCycler IQ detection system. Primers used for qPCR are listed in Table 1. The PCR were run for 45 cycles with an annealing temperature of 60°C for 30 seconds. Gene expression was calculated using the CT method [i.e., $1/(2^{\Delta C T})$, where $\Delta C T = C T_{\text{target}} - C T_{\text{reference}}$] after normalization to β -actin level. The relative fluorescence units were analyzed with the iQ5 software (Bio-Rad).

3.3.6 Immunoblotting

Proteins were obtained by harvesting cells with RIPA buffer containing protease inhibitors. Proteins (30 µg) were separated by 9% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by western blotting to nitrocellulose membrane. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk for 2 hours at room temperature. Anti-LDLr, -apoA-I, -pAMPK, (1/1000), anti-AMPK, -SR-BI, -PCSK9, -CD36 (1/2000), - β -actin (1/5000), were diluted in TBS-T (20 mM Tris, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and incubated with the membranes overnight at 4°C. The membranes were washed three times with TBS-T. The second antibodies (anti-mouse or -rabbit IgG) conjugated to horseradish peroxidase (1/5000) were diluted in TBS-T and

incubated with membranes for one hour at room temperature. The membranes were washed three times with TBS-T and the signals visualized using enhanced chemiluminescence HRP substrate (Millipore, Toronto, Canada).

3.3.7 Lipid and apoA-I level determinations

Prior to the estimation of HepG2 cell CHOL and TG, lipids were extracted as previously described by Hara and Radin et al, (1978). CHOL and TG levels, as well as apoA-I in medium were quantified with kits according to the manufacturer's recommendations.

3.3.8 Confocal microscopy

Cells were plated on 35 mm glass bottom dishes poly-*d*-lysine coated prior to staining for immunofluorescence. HepG2 cells were treated with AICAR (1 mM) for 24 hours in MEM with 10% FBS at room temperature. Briefly, cells were washed three times with PBS for 5 minutes, blocked with PBS containing 2% BSA and 6% FBS, washed three times (5 minutes each) in PBS, incubated with primary rabbit anti-SR-BI antibody (1:500) in PBS with 2% BSA for 30 minutes, rinsed 3 times with PBS (5 minutes each), incubated with Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG in PBS with BSA 2% for 1 hour in the dark, rinsed three times in PBS (5 minutes each), treated with Hoechst 33342 for 5 minutes, rinsed 3 times in PBS (5 minutes each), incubated with Cellmask (1/5000) in PBS at 37°C for 7 minutes and finally rinsed with PBS twice (5 minutes each). All samples were viewed using a Bio-Rad laser confocal fluorescence microscope (Bio-Rad, Hercules, California). Total SR-BI signal area was quantified using the Image J software and compare between cells control and treated with AICAR.

3.3.9 Statistic study

Unpaired Student's t-test was used to obtain statistical comparisons of the data. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$ when compared to control.

3.4 RESULTS

We first identified the optimal concentrations of metformin and AICAR to be used on HepG2 cells. HepG2 cells were treated 24 hours with 1, 2, and 4 mM of metformin and with 0.5, 1 and 2 mM of AICAR. As presented in figure 1, 2 mM of metformin and 1 mM of AICAR seem to have the most important effect on LDLr, SR-BI and CD36 protein expression overall. Furthermore, MTT assays have shown that these concentrations had no deleterious effect on cell viability after a 24 hour treatment, except for the 4mM metformin concentration which had a small deleterious effect. These concentrations were used for all following experiments which overall show an LDLr and CD36 augmentation and a SR-BI reduction after both treatments. Figure 3.2 shows that they were efficient to phosphorylate AMPK. Indeed, AICAR significantly increased the level of phosphorylated AMPK (pAMPK) (by 38% after 15 minutes), however this is followed by dephosphorylation (69% and 95% reduction after 6 and 24 hours). Metformin rapidly leads to a higher level of pAMPK (by 115% after 5 minutes). The drugs have no effect on total level of AMPK level. Those results indicate that they influence AMPKp/AMPK ratio differently, leading or not to a sustained phosphorylation/activation. As mentioned earlier, AMPK activation inhibits the synthesis of CHOL and TG through HMG-CoA reductase inhibition (Oliaro-Bosso et al, 2009) and ACC phosphorylation respectively (Davies et al, 1992). Therefore, the cellular level of TG and CHOL, after both treatments, was measured to confirm AMPK activation. Table 3.2 demonstrates that after 24 hours, metformin and AICAR reduced cellular TG by 31% and 42%, and CHOL by 36% and 23%, respectively. Compound C, an AMPK inhibitor, resulted in 62% and 23% increases in cellular TG and CHOL levels, respectively, thus confirming that these effects are due to AMPK activation.

Figure 3.3 shows that metformin raised the LDLr protein level, reaching a 109% increase after 24 hours of treatment. LDLr mRNA level is also significantly increased by 43% after a 24-hour treatment. AICAR strongly increased the LDLr protein level after 24-hours treatment, with an 820% increase. The same phenomenon is visible for the LDLr mRNA level with a 198% increase after 24 hours. Since the increase in LDLR protein

was higher than the mRNA, we suspected that PCSK9 levels also influenced the LDLr. For this reason, PCSK9 secreted in culture cell medium was quantified (Figure 3.4). The level of PCSK9 in the medium was reduced by 54% by metformin and 77% by AICAR after 24 hours of treatment. These results indicate that both drugs act on the LDLr at the transcriptional and post-transcriptional steps. Figure 3.5 demonstrates that metformin reduces the SR-BI protein level after 6 and 24 hours by 54% and 68%, respectively, and AICAR by 62% after 24 hours. SR-BI mRNA level has a similar response after 24 hours treatment with AICAR.

In order to show if the activity of lipoprotein receptors correlates with their modulation, total lipoprotein degradation and selective uptake were investigated after 24h of treatment with AMPK activators. AMPK activation significantly enhances LDL degradation by 52% and CE-SU by 42% (Table 3.3). HDL degradation was significantly reduced by AICAR 8%. Differently, HDL CE-SU rose up by 69%. Since SR-BI reduction did not correlate with CE-SU enhancement, its presence on the cell surface after AICAR treatment was investigated by confocal microscopy. Quantification of images containing approximately 15 cells, from 3 different experiments revealed that AICAR significantly enhances SR-BI co-localized with Cellmask, a cell membrane marker, by 101% (Figure 3.6). Therefore, despite an overall reduction in total SR-BI level, cell surface SR-BI, the active fraction in SU, increases with AMPK activation. CD36, a receptor known also to have some SU activity on both LDL and HDL was also investigated. Figure 3.7 shows that metformin significantly enhanced the CD36 protein level after 15 minutes, 1 and 6 hours (35, 35 and 22%, respectively). CD36 mRNA follows the protein modulation but is only significantly different after 6 hours of treatment (27% augmentation). AICAR rose the CD36 protein level but only after a 24 hours treatment (47% augmentation). This correlates with CD36 mRNA (220% augmentation).

In order to evaluate the potential effect of AMPK activation on HDL biogenesis, we evaluated the effect of metformin and AICAR on apoA-I expression. Figure 3.8 shows that both drugs reduce HepG2 cellular apoA-I content, AICAR having a more significant effect (64% and 28% reduction for 6 and 24 hours with metformin and 30%, 45% and 45% reduction for 1, 6 and 24 hours with AICAR). Since apoA-I is secreted from

hepatocytes, its level in the culture medium was also quantified. Both treatments had about the same reduction effect (approximately 40%) after 24 hours (Figure 3.9). Interestingly, quantification of apoA-I mRNA only shows a 49% significant reduction with metformin after the 24 hours treatment, while AICAR rather leads to a significant increase of 40% after 15 minutes (Figure 3.7). Therefore, apoA-I degradation was investigated by inhibiting proteasomal activity with MG132 for 24 hours. Figure 3.9 shows a 96% rescue of apoA-I level when treated with MG132 and AICAR compared to the cells only treated with AICAR, indicating that AICAR reduced apoA-I level through a degradation pathway.

3.5 DISCUSSION

This study was meant to thoroughly define the *in vitro* effects of AMPK activation by metformin and AICAR in HepG2 cells regarding lipoprotein metabolism. The reason why AICAR leads to a faster phosphorylation of AMPK than metformin could be explained by a more direct activation pathway (reviewed by Foretz et al, 2006; Zou et al, 2001). Indeed, AICAR is taken up by the cells and forms an AMP mimetic (ZMP) which directly interacts with AMPK (Corton et al, 1995). AICAR is also known to activate AMPK by LKB1-mediated phosphorylation (Hawley et al, 2003). Differently, metformin indirectly affects AMPK by inhibiting the electron transport chain causing a higher pool of AMP (Owen et al, 2000). Table 3.2 shows that metformin and AICAR reduce CHOL and TG in hepatic cells suggesting that AMPK phosphorylation act similarly by in synonymous of inhibition of the key biosynthetic enzymes, HMG-CoA reductase and ACC (Davies et al, 1992 ; Oliaro-Bosso et al, 2009).

It is known that lipoprotein receptors are one of the main determinants of lipoprotein cholesterol levels. Therefore, their modulation following AMPK activation was investigated. Briefly, we found that both drugs enhance LDLr protein level and moderately its mRNA level. This LDLr modulation is very likely happening through a rise of the sterol regulatory element-binding transcription factor 2 (SREBP-2) as previously shown in the mouse (Horton et al, 1998; Castoreno, 2005). After 24 hours of treatment, AICAR significantly reduced PCSK9 accumulation in the medium, a protein known to lead to lysosomal degradation of hepatic LDLr (Maxwell et al, 2004-2005). Those reductions in the medium combined with a rise in LDLr mRNA must explain the LDLr protein rise.

We found that both drugs reduced the transcription of SR-BI gene after 24 hours. Many signaling pathways could be implicated in this regulation. Among them, p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) stimulation, was shown to downregulate SR-BI expression in HepG2 cells and in rats (Murao et al, 2008). Since AMPK enhances glucose transport through p38 MAPK stimulation (Xi et al, 2001), we propose that AMPK could modulate SR-BI through p38 MAPK. On the contrary, CD36 rises in response to both drugs. It is already known that CD36 is capable of SU in absence of SR-

BI. Indeed, it was reported by our laboratory that CD36 has a SU activity toward LDL SU in SR-BI KO mice (Luangrath et al, 2008). Thus, it is possible that the SR-BI reduction by AMPK triggers CD36 synthesis to rescue SU activity on lipoprotein.

We investigated if the modulation of the receptors following the AMPK activation influences LDL and HDL global and selective uptake. We found that increasing AMPK phosphorylation significantly enhances LDL degradation (Table 3.2) which correlates with the higher LDLr level. This last finding is in accordance with the findings of Wang et al, (2008). CE-SU also rose up (Table 3.2) even if total SR-BI protein level was diminished. As abovementioned, these contradictory results can be explained by the rise in cell surface SR-BI and by the increase in CD36 content. PDZKI, a protein playing a role in SR-BI translocation to the cell surface, might be responsible for these results (Kocher et al, 2003), but quantification of its total protein level by Western blot has shown no modulation after treatments with metformin or AICAR (data not shown). Very interestingly, Bolen et al, (2007) have shown that metformin treated patients show LDL-CHOL reduction. Their findings strongly parallel our experiments, since we observed higher LDLr levels and SR-BI translocation on cell membrane in metformin treated HepG2 cell.

HDL biogenesis depends on apoA-I synthesis and secretion from hepatic cells. Our results in HepG2 cells showed that both drugs reduce the cellular apoA-I protein level. Surprisingly apoA-I mRNA modulation only correlates with the protein level in metformin treated cells. On the contrary, AICAR showed an increase level of apoA-I mRNA. Metformin probably acts through HNF4 α , a nuclear receptor known to play a role in apoA-I transcription (Leclerc et al, 2001). Moreover, it is already well established that hepatocyte nuclear factor (HNF) is phosphorylated and inactivated by AMPK (Hong et al, 2003). So AMPK could reduce apoA-I expression through HNF4 α reduction.

It was previously suggested that apoA-I can be degraded through the proteasomal pathway (Anjum et al, 2013). Since it was demonstrated that AICAR can reverse an inhibition of this same pathway (Chotechuang et al, 2011), we hypothesised that AICAR reduces apoA-I protein level by enhancing its proteasomal degradation. Indeed, when cells were treated with both AICAR and MG132, an inhibitor of the proteasome, the level

of apoA-I was restored when compared with AICAR treated cells. Unexpectedly, when cells were treated only with MG132, the level of apoA-I was lower than in AICAR and MG132 treated cells. It is known that FXR is a nuclear factor that suppresses apoA-I transcription (Claudel et al, 2002) and that the FXR level is enhanced when cells are exposed to MG132 since FXR is normally degraded by the proteasomal pathway (Kemper et al, 2009). Therefore, we hypothesize that when exposed to MG132, the apoA-I level of HepG2 cells is reduced by the FXR increase. Thus, the apoA-I is largely degraded by the proteasomal pathway when treated with AICAR. So it is possible that, when exposed to AICAR and MG132, proteasome inhibition is more significant than the downregulation through FXR, causing an overall apoA-I augmentation.

Overall, our work suggests that AMPK activation by metformin and AICAR affects lipoprotein metabolism through the modulation of their receptors and precursors. Both drugs increase LDLr mRNA levels. The higher LDLr levels can also be explained by PCSK9 modulation. Those results suggest that AMPK activation could reduce LDL-CHOL in treated patients. Furthermore, SR-BI expression level decreases with metformin and AICAR, which is in contradiction with the observed higher HDL-CE and LDL-CE SU activities. Both CD36 and cell surface SR-BI enhancements could explain the rises in CE-SU. Independently, both AICAR and metformin reduce the apoA-I level but in a different manner. We showed that AICAR acts on apoA-I protein level via proteasomal degradation while metformin acts via a reduction in its synthesis. To our knowledge this study is the first one to identify that AMPK activation plays a key role in lipoprotein metabolism in human hepatocyte cells. This study also proposes that AMPK activation have beneficial effects by rising LDLr level and lipoprotein-CE selective uptake, thus being beneficial for lowering LDL cholesterol and maybe prevent cardiovascular diseases like atherosclerosis.

3.6 REFERENCES

- Acton, S. L., Rigotti, A., Landschultz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H. and Krieger, M. 1996.** Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271: 518-520.
- Barter, P. J. and Rye, K. A. 2014.** Regulation of High-Density Lipoprotein Metabolism. *Circ Res.* 114: 124-142.
- Bolen, S., Feldman, L., Vassy, J., Wilson, L., Yeh, H.C., Marinopoulos, S., Wiley, C., Selvin, E., Wilson, R., Bass, E. B. and Brancati, F. L. 2007.** Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 147: 386-399.
- Brewer, H. B. Jr, Sprecher, D. L., Gregg, R. E. and Hoeg, J. M. 1985.** Risk factors for the development of premature cardiovascular disease. *Adv Exp Med Biol.* 183: 27-36.
- Brisette, L., Charest, M. C. and Faltraut, L. 1996.** Selective uptake of cholesteryl esters of low-density lipoproteins is mediated by the lipoprotein-binding site in HepG2 cells and is followed by the hydrolysis of cholesteryl esters. *J Biochem.* 318: 841-847.
- Brodeur, M. R., Bourret, G., Faltraut, L. and Brisette, L. 2005.** Physiological importance of SR-BI in the *in vivo* metabolism of human HDL and LDL in male and female mice. *J Lipid Res.* 46: 687-696.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1974.** Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *J Biol Chem.* 249: 7306-7314.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1986.** A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47.
- Castoreno, A. B., Wang, Y., Stockinger, W., Jarzylo, L. A., Du, H., Pagnon, J. C., Shieh, E. C. and Nohturfft, A. 2005.** Transcriptional regulation of phagocytosis-induced membrane biogenesis by sterol regulatory element binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 13129-13134.
- Chotechuang, N., Azzout-Marniche, D., Bos, C., Chaumontet, C., Gaudichon, C. and Tomé, D. 2011.** Down-regulation of the ubiquitin-proteasome proteolysis system by amino acids and insulin involves the adenosine monophosphate-activated protein kinase and mammalian target of rapamycin pathways in rat hepatocytes. *Amino Acid.* 41: 457-468.

Claudel, T., Sturm, E., Duez, H., Torra, I. P., Sirvent, A., Kosykh, V., Fruchart, J. C., Dallongeville, J., Hum, D. W., Kuipers, F. and Staels, B. 2002. Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest.* 109: 961-971.

Connelly, M. A., Klein, S. M., Azhar, S., Abumrad, N. A. and Williams, D. L. 1999. Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J Biol Chem.* 274: 41-47.

Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A. and D. G. Hardie. 1995. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem.* 229: 558-565.

Davies, S. P., Carling, D., Munday M. R. and Hardie, D. G. 1992. Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets. *Eur J Biochem.* 203: 615-623.

Fabre, A. C., C. Malaval, A. Ben Addi, C. Verdier, V. Pons, N. Serhan, L. Lichtenstein, G. Combes, T. Huby, F. Briand, X. Collet, N. Nijstad, U. J. Tietge, B. Robaye, B. Perret, J. M. Boeynaems, and L. O. Martinez, 2010. P2Y₁₃ receptor is critical for reverse cholesterol transport. *Hepatology* 52: 1477-1483.

Fisher, E. A., Feig, J. E., Hewing, B., Hazen, S. L. and Smith, J. D. 2012. High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32: 2813-2820.

Foretz, M., Taleux, N., Guigas, B., Horman, S., Beauloye, C., Andreelli, F., Bertrand, L. and Viollet, B. 2006. Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases. *Med Sci.* 4: 381-388.

Grossman, A. B., Korbonits, M., Kola, B., Boscaro, M., Rutter, G. A., Kola, B. and Boscaro, M. 2006. Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab.* 17: 205-215.

Hara, A., Radin, N. S. 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem.* 90: 420-426.

Hatch, F. T. and Lees, R. S. 1968. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv Lipid Res.* 6: 1-68.

Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Makela, T. P., Alessi, D. R. and Hardie, D. G. 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol.* 2: 28.

Hong, Y. H., Varanasi, U. S., Yang, W. and Leff, T. 2003. AMP-activated protein kinase regulates HNF4 transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *J Biol Chem.* 278: 27495-27501.

Horton, J. D., Shimomura, I., Brown, M. S., Hammer, R. E., Goldstein, J. L. and Shimano, H. 1998. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest.* 101: 2331-2339.

Kemper, J. K., Xiao, Z., Ponugoti, B., Miao, J., Fang, S., Kanamaluru, D., Tsang, S., Wu, S. Y., Chiang, C. M. and Veenstra, T. D. 2009. FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell Metab.* 10: 392-404.

Kocher, O., Yesilaltay, A., Cirovic, C., Pal, R., Rigotti, A. and Krieger, M. 2003. Targeted disruption of the PDZK1 gene in mice causes tissue-specific depletion of the high density lipoprotein receptor scavenger receptor. *J Biol Chem.* 278: 52820-52825.

Langer, T., Strober, W. and Levy, R. I. 1972. The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest.* 51: 1528-1536.

Lazar, J., Soh, J., Albitar, M., Gowda, S., Hussain, M. M. and Wadgaonkar, R. 2013. Dysregulation of ubiquitin-proteasome pathway and apolipoprotein A metabolism in sickle cell disease-related pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ.* 3: 851-855.

Leclerc, I., Lenzner, C., Gourdon, L., Vaultont, S., Kahn, A. and Violette, B. 2001. Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 50: 1515-1521.

Luangrath, V., Brodeur, M. R., Rhoads, D. and Brissette, L. 2008. Mouse CD36 has opposite effects on LDL and oxidized LDL metabolism in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28: 1290-1295.

Martinez, L. O., Jacquet, S., Esteve, J. P., Rolland, C., Cabezon, E., Champagne, E., Pineau, T., Georgeaud, V., Walker, J. E., Tercé, F., Collet, X., Perret, B. and Barbaras, R. 2003. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 421: 75-79.

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 USA.* 101: 7100-7105.

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 USA*. 102: 2069-2074.

McFarlane, A. S. 1948. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* 182: 53-54.

Murao, K., Yu, X., Imachi H., Cao, W. M., Chen, K., Matsumoto, K., Nishiuchi, T., Wong, N. C. and Ishida, T. 2008. Hyperglycemia suppresses hepatic scavenger receptor class B type I expression. *Am J Physiol*. 294: 78-87.

Nelson, L. E., Valentine, R. J., Cacicedo, J. M., Gauthier, M. S., Ido, Y. and Ruderman, N. B. 2012. A novel inverse relationship between metformin-triggered AMPK-SIRT1 signaling and p53 protein abundance in high glucose-exposed HepG2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 303: 4-13.

Ni, Y. G., Condra, J. H., Orsatti, L., Shen, X., Di Marco, S., Pandit, S., Bottomley, M. J., Ruggeri, L., Cummings, R. T. and Cubbon, R. M. 2010. A proprotein convertase subtilisin-like/kexin type 9 (PCSK9) C-terminal domain antibody antigen-binding fragment inhibits PCSK9 internalization and restores low density lipoprotein uptake. *J Biol Chem*. 285: 12882-12891.

Oliaro-Bosso, S., Calcio Gaudino, E., Mantegna, S., Giraud, E., Meda, C., Viola, F. and Cravotto, G. 2009. Regulation of HMGCoA reductase activity by policosanol and octacosadienol, a new synthetic analogue of octacosanol. *Lipids* 44: 907-916.

Owen, M.R., Doran, E. and Halestrap, A.P. 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *J Biochem*. 348: 607-614.

Park, H. W., Park, H., Ro, S. H., Jang, I., Semple, I. A., Kim, D. N., Kim, M., Nam, M., Zhang, D., Yin, L. and Lee, J. H. 2014. Hepatoprotective role of Sestrin2 against chronic ER stress. *Nat Commun*. 5: 4233.

Rhains, D., Brodeur, M., Lapointe, J., Charpentier, D., Falstraalt, L. and Brissette, L. 2003. The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters. *Biochemistry* 42: 7527-7538.

Roberts, D. C., Miller, N. E., Price, S. G., Crook, D., Cortese, C., la Ville, A., Masana, L. and Lewis, B. 1985. An alternative procedure for incorporating radiolabelled cholesteryl ester into human plasma lipoproteins in vitro. *J Biochem*. 226: 319-322.

Ross, R. 1999. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 340: 26-115.

Rye, K. A., Clay, M. A. and Barter, P. J. 1999. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 145: 227-238.

Smith, J. D., Le Goff, W., Settle, M., Brubaker, G., Waelde, C., Horwitz, A. and Oda, M. N. 2004. ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* 45: 635-644.

Spencer-Jones, N. J., D. Ge, H. Snieder, U. Perks, R. Swaminathan, T. D. Spector, N. D. Carter, and S. D. O'Dell. 2006. AMP-kinase alpha2 subunit gene PRKAA2 variants are associated with total cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol and high-density lipoprotein-cholesterol in normal women. *J Med Genet.* 43: 936-942.

Steinberg, D. 1997. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem.* 272: 20963-20966.

Wang, H. M., Bansode, R., Huang, W. and Mehta K.D. 2008. AICAR positively regulate glycogen synthase activity and LDL receptor expression through Raf-1/MEK/p42/44MAPK/p90RSK/GSK-3 signaling cascade. *Biochem Pharmacol.* 75: 457-467.

Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F. and Tall, A. R. 2004. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 9774-9779.

Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., Carling, D., Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M. and Carling, D. 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol.* 13: 2004-2008.

Xi, X., Han, J. and Zhang, J. Z. 2001. Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 276: 41029-41034.

Zhou, G., Myers, R., Li Y., Chen, Y., Shen X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 108: 1167-1174.

3.7 FIGURE AND LEGENDS

Figure 3.1: Effect of metformin and AICAR on cell viability and lipoprotein receptors modulation in HepG2 cells

Upper panel: Cell MTT activity for different metformin and AICAR concentrations (0 to 10 mM) for 25 hours. The results represent mean \pm SEM of 3 triplicates per condition. Lower panel: HepG2 cells were treated for 24 hours in MEM + 10% FBS and AICAR (0 to 2 mM) or metformin (0 to 4 mM). After extraction, proteins were subjected to immunoblotting for LDLr, SR-BI and CD36 as described in the Materials and method section.

Figure 3.2: Effect of metformin and AICAR on AMPKp and AMPK levels in HepG2 cells

HepG2 cells were treated for the indicated time in MEM + 10% FBS with or without metformin (2 mM) or AICAR (1 mM). Proteins were quantified by immunoblotting with antibodies against AMPKp (Thr172) and AMPK as described in Materials and methods. Densitometry was achieved using imageJ software. The results represent mean \pm SEM of 3 duplicates per condition. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.0005$ compared to control (unpaired t-test).

Figure 3.3: Effect of metformin and AICAR on LDLr expression in HepG2 cells

HepG2 cells were treated for the indicated time in MEM + 10% FBS with or without metformin (2 mM) or AICAR (1 mM). Proteins were quantified by immunoblotting with antibodies against LDLr as described in Materials and methods. Densitometry was achieved using imageJ software. qPCR were performed with specific primers for LDLr mRNA. The results represent mean \pm SEM of 3 triplicates per condition. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ compared to control (unpaired t-test).

Figure 3.4: Effect of metformin and AICAR on PCSK9 level in medium of HepG2 cells

HepG2 cells were treated for indicated time in MEM + 10% FBS and AICAR (1 mM) or metformin (2 mM) and 50 μ l of culture medium was immunoblotted against PCSK9. The

results represent mean \pm SEM of 3 duplicates per condition. * $p < 0.05$ compared to control (unpaired t-test).

Figure 3.5: Effect of metformin and AICAR on SR-BI expression in HepG2 cells

HepG2 cells were treated for the indicated time in MEM + 10% FBS with or without metformin (2 mM) or AICAR (1 mM). Proteins were quantified by immunoblotting with antibodies against SR-BI as described in Materials and methods. Densitometry was achieved using imageJ software. qPCR were performed with specific primers for SR-BI mRNA. The results represent mean \pm SEM of 3 duplicates per condition. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ compared to control (unpaired t-test).

Figure 3.6: Immunofluorescence analysis of HepG2 cells expressing SR-BI on cellular membrane

Control and treated cells with AICAR (1 mM) for 24 hours were incubated with anti-SR-BI rabbit polyclonal antibody followed by Alexa 488 goat anti-rabbit IgG. Cellmask and Hoechst 33342 were used to mark cell-membrane and nucleus, respectively. A Z-plane image is shown in A-D with white arrows demonstrating the SR-BI presence on the cell surface. The SR-BI fluorescence of z stack is shown in B-E, and the merge z stack images are shown in C-F. These images are representative data from three independent experiments. Graphic represent quantification of SR-BI co-localized with Cellmask, from 3 different experiments. * $p < 0.05$ compared to control (unpaired t-test).

Figure 3.7: Effect of metformin and AICAR on CD36 expression in HepG2 cells

HepG2 cells were treated for the indicated time in MEM + 10% FBS with or without metformin (2 mM) or AICAR (1 mM). Proteins were quantified by immunoblotting for CD36 as described in Materials and methods. Densitometry was achieved using imageJ software. QPCR were performed with specific primers for CD36 mRNA. The results represent mean \pm SEM of 3 duplicates per condition. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ -compared to control (unpaired t-test).

Figure 3.8: Effect of metformin and AICAR on apoA-I expression in HepG2 cells

Proteins were quantified by immunoblotting with antibodies against apoA-I as described in Materials and methods. Densitometry was achieved using imageJ software. qPCR were performed with specific primers for apoA-I mRNA. The results represent mean \pm SEM of 3 duplicates per condition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ and *** $p < 0.0005$ compared to control (unpaired t-test).

Figure 3.9: Effect of metformin, AICAR and MG132 on apoA-I cellular levels and secretion by HepG2 cells.

Upper panel: HepG2 cells were treated for 1, 6 or 24 hours in MEM + 10% FBS with AICAR (1 mM). Total apoA-I amount from culture medium was measured by ELISA according to the manufacturer's instructions. Lower panel: HepG2 cells were treated for 8 hours with AICAR (1 mM) with or without MG132 (0.25 microM) and total apoA-I was measured by ELISA. The results represent mean \pm SEM of 3 duplicates per condition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ and *** $p < 0.0005$ compared to control (unpaired t-test).

Table 3.1 Forward and reverse primers for qPCR

| Proteins | Primers | |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|
| | Forward | Reverse |
| β-actin | AGA GCT ACG AGC TGC CTG AC | GTA CTT GCG CTC AGG AGG AG |
| rLDL | CCC CGC AGA TCA AAC CCC CAC C | TCT GTC TCG AGG GGT AGC TG |
| SR-BI | AGG CAT TGG ACA AAC TGG GAA | GCC TCC TTA TCC TTT GAG CCC |
| CD36 | AAA TAA ACC TCC TTG GCC TGA | GCA ACA AAC ATC ACC ACA CC |
| ApoA-I | GAG ACT GCG AGA AGG AGG TC | GCT GTC CCA GTT GTC AAG GA |

Table 3.2 Effect of AICAR, metformin and compound C on HepG2 cell intracellular triglyceride and cholesterol content.

| Treatment | Cell triglyceride content % of control | Cell cholesterol content % of control |
|-------------------|---|--|
| AICAR | 53.4 ± 16.1* | 77.1 ± 3.8* |
| Metformin | 69.1 ± 11.5* | 64.0 ± 10.4* |
| Compound C | 162.2 ± 24.2* | 123.1 ± 2.7* |

HepG2 cells were incubated with MEM + 10% FBS with or without AICAR (1 mM), metformin (2 mM) or the AMPK inhibitor Compound C (15 μ M) for 24 hours. Cellular lipids were extracted and measured with enzymatic kits as described in Materials and methods. The control value was set as 100%. Mean \pm SD is shown, n=5 experiments in duplicates. * p<0.05 compared to control (unpaired t-test).

Table 3.3 Effect of AICAR on LDL and HDL metabolism in HepG2 cells

| | Effect of AICAR % of control |
|--------------------------------|---|
| LDL-protein degradation | 159.2 ± 24.2* |
| LDL-CE SU | 142.0 ± 8.1* |
| HDL-protein degradation | 92.1 ± 5.2* |
| HDL-CE SU | 168.9 ± 12.8 * |

HepG2 cells were treated for 24h in MEM + 10% FBS with or without AICAR (1 mM) and LDL and HDL association and degradation were quantified as described in Materials and methods. Control value was set as 100%. Mean ± SD is shown, n=4 experiments in triplicate. * p<0.05 compared to control (unpaired t-test).

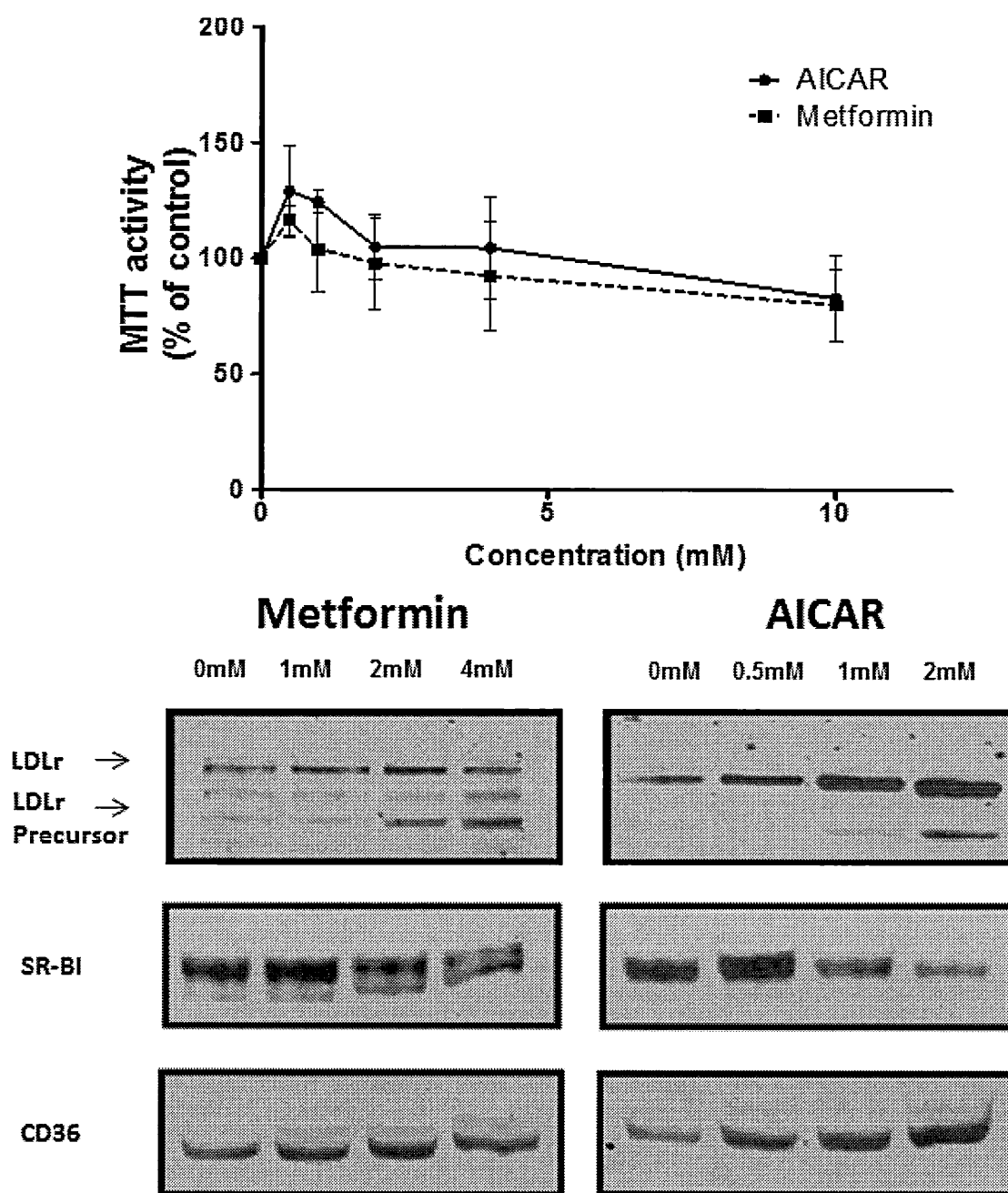


Figure 3.1 Effect of metformin and AICAR on cell viability and lipoprotein receptors modulation in HepG2 cells

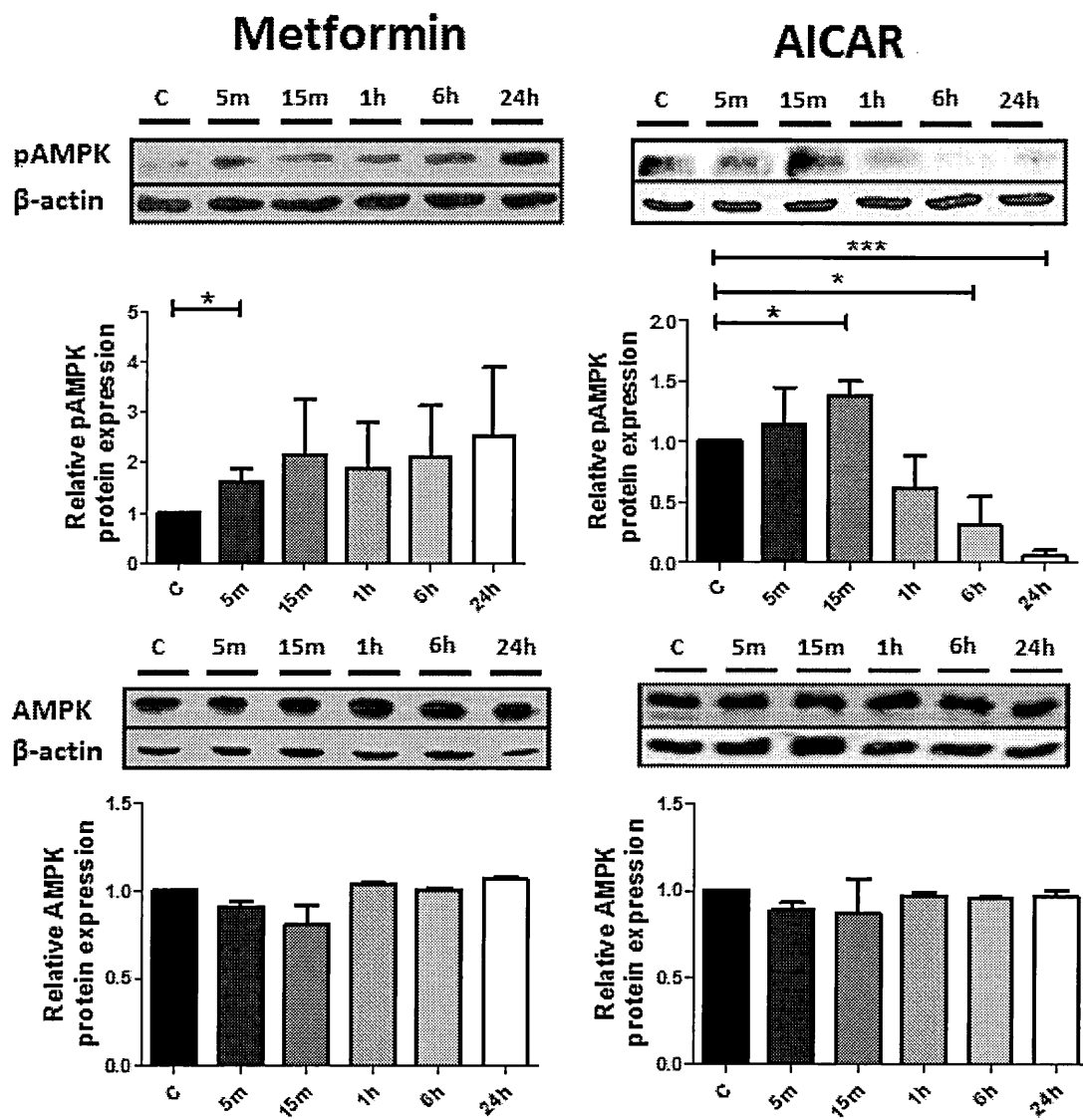


Figure 3.2 Effect of metformin and AICAR on AMPKp and AMPK levels in HepG2 cells

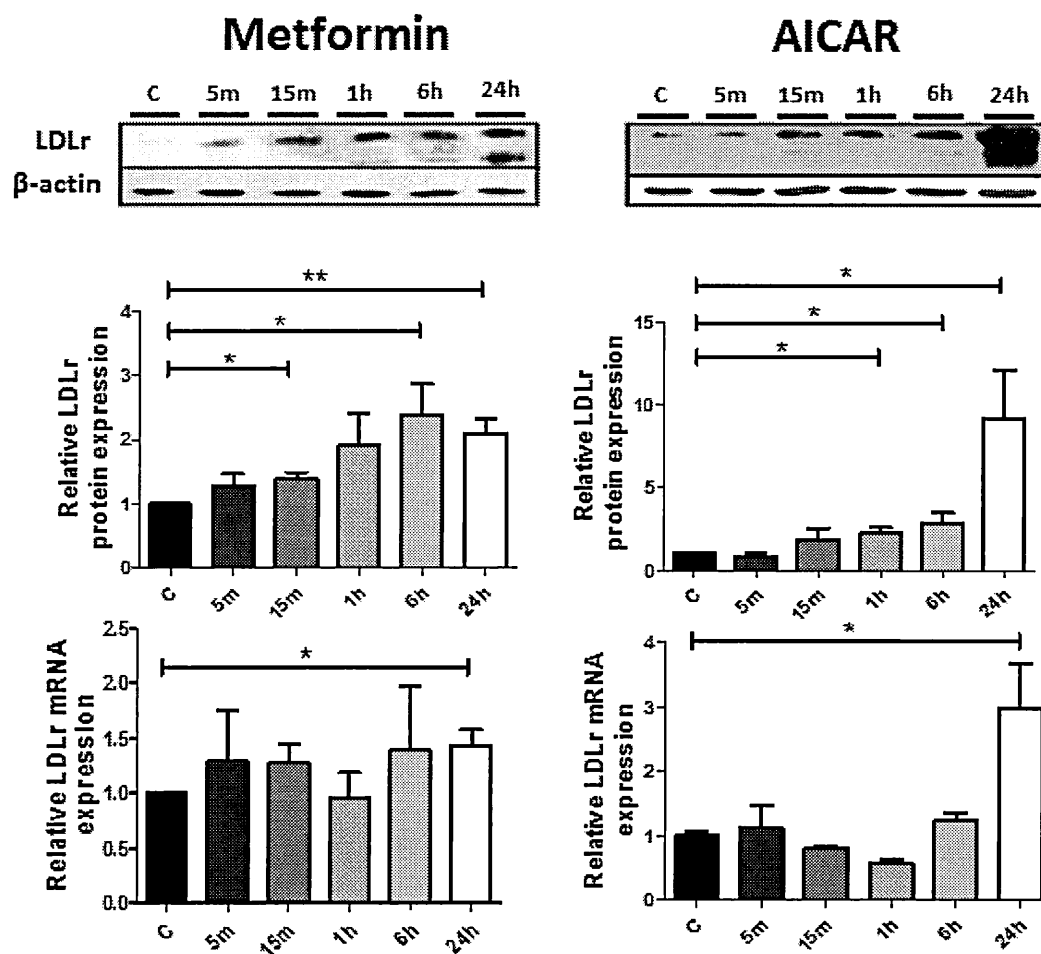


Figure 3.3 Effect of metformin and AICAR on LDLr expression in HepG2 cells

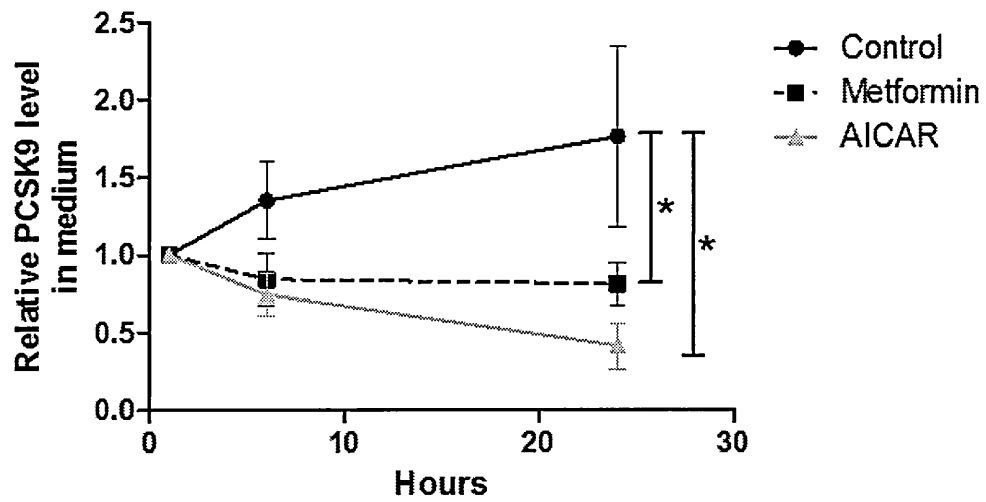


Figure 3.4 Effect of metformin and AICAR on PCSK9 level in medium of HepG2 cells

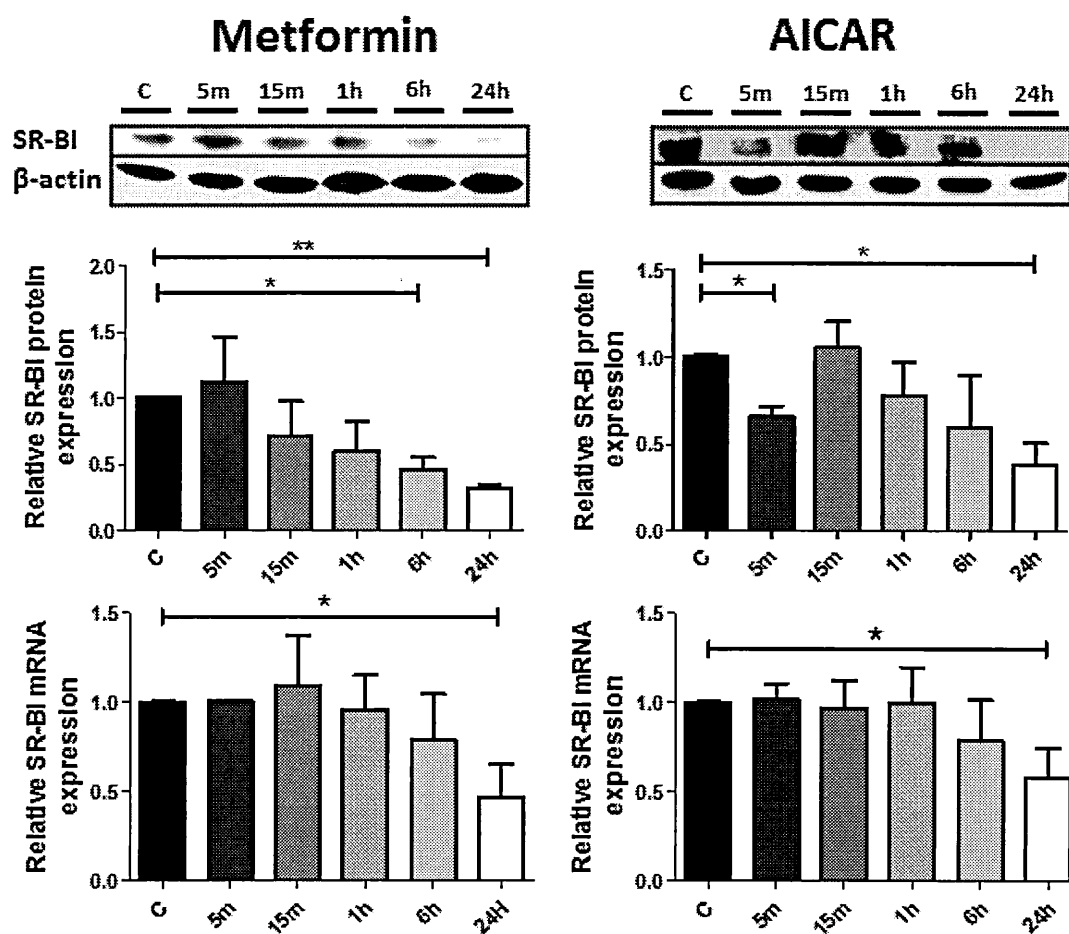


Figure 3.5 Effect of metformin and AICAR on SR-BI expression in HepG2 cells

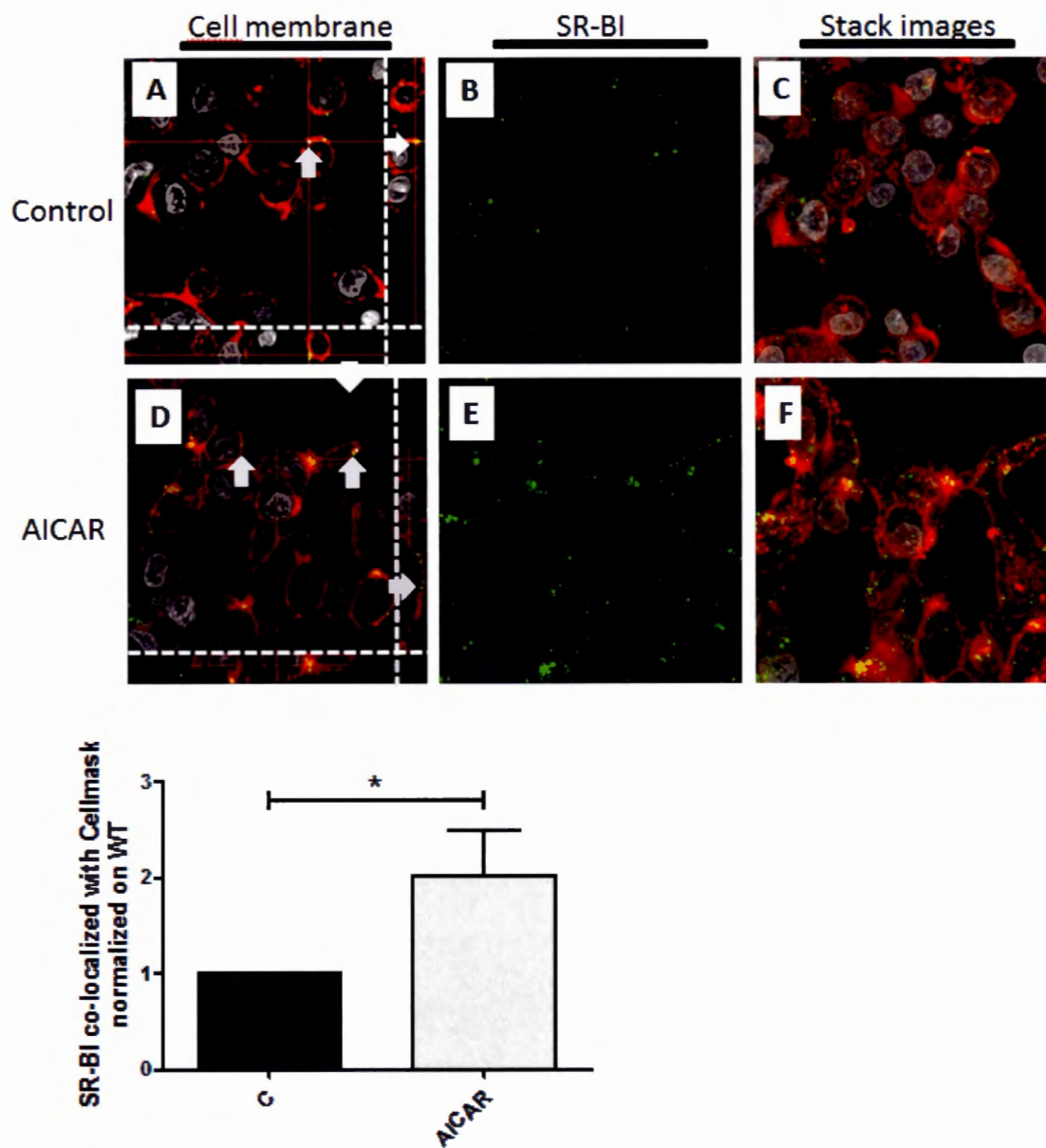


Figure 3.6 Immunofluorescence analysis of HepG2 cells expressing SR-BI on cellular membrane

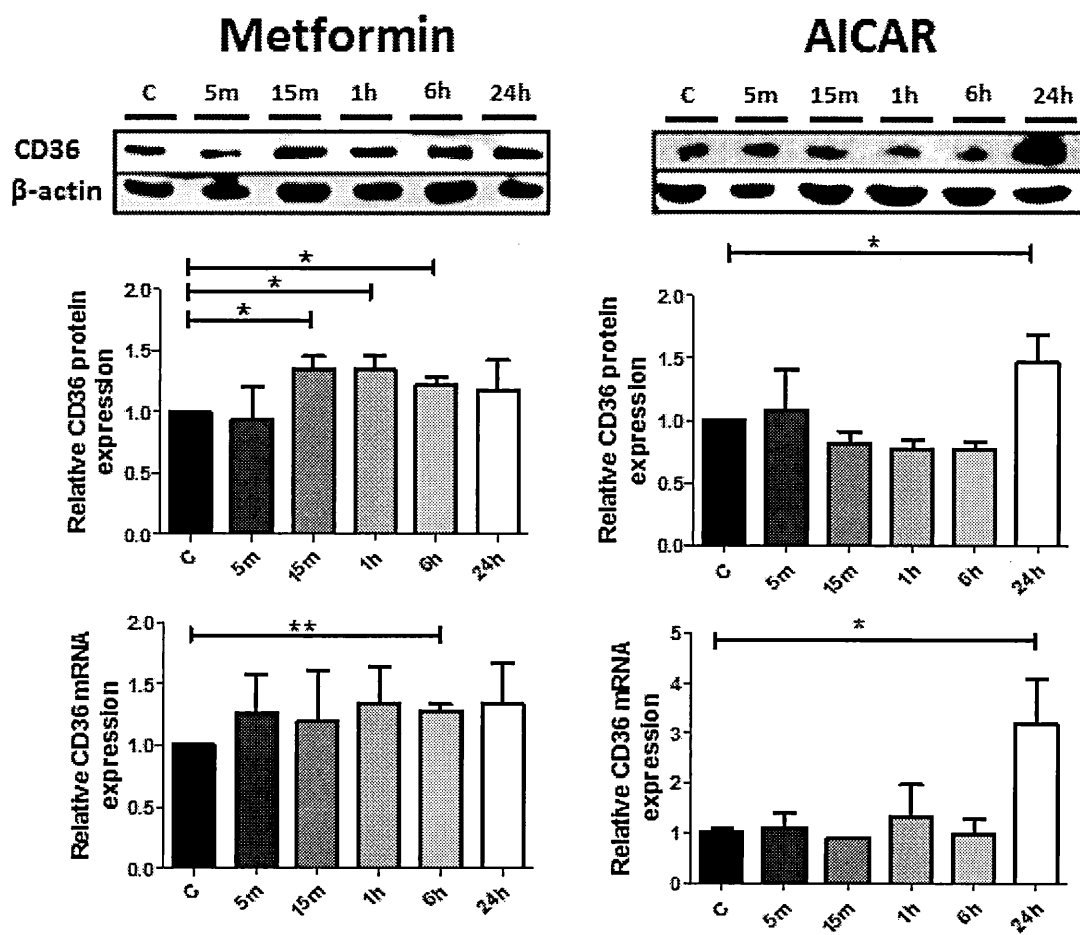


Figure 3.7 Effect of metformin and AICAR on CD36 expression in HepG2 cells

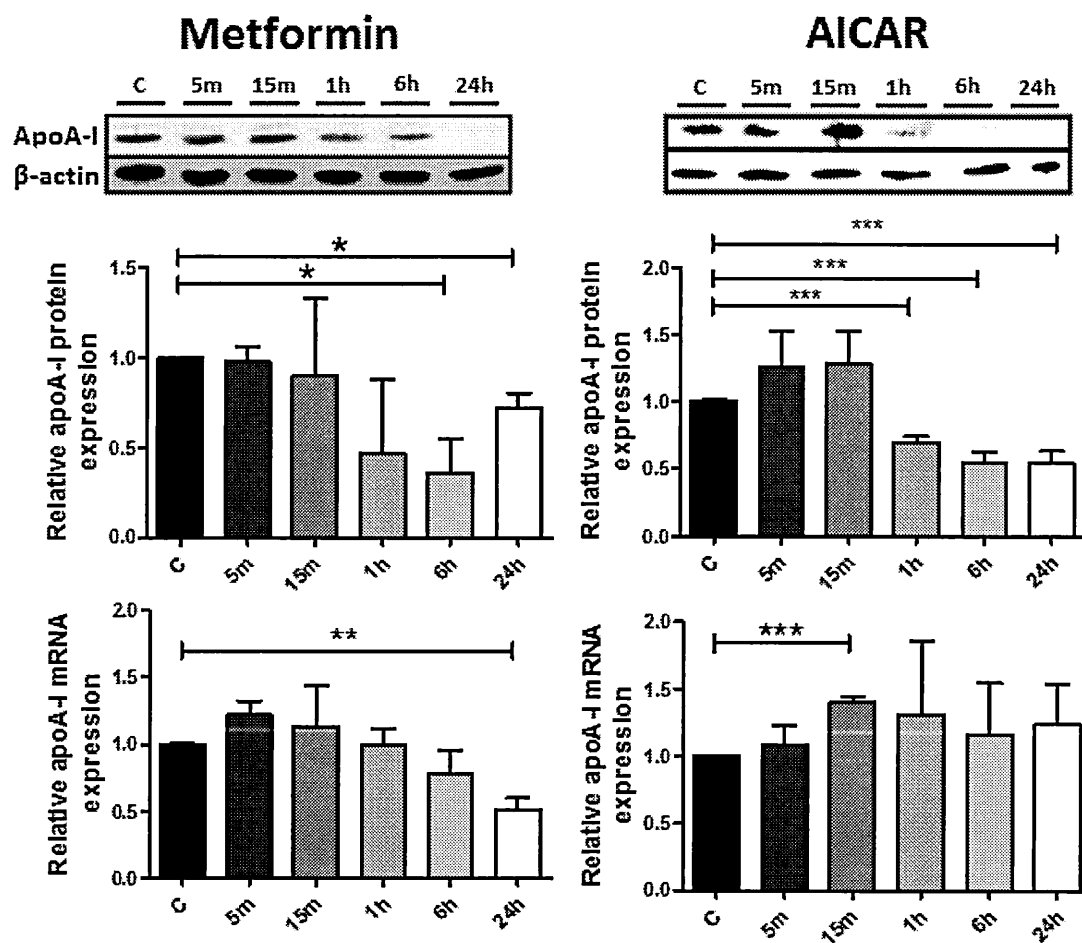


Figure 3.8 Effect of metformin and AICAR on apoA-I expression in HepG2 cells

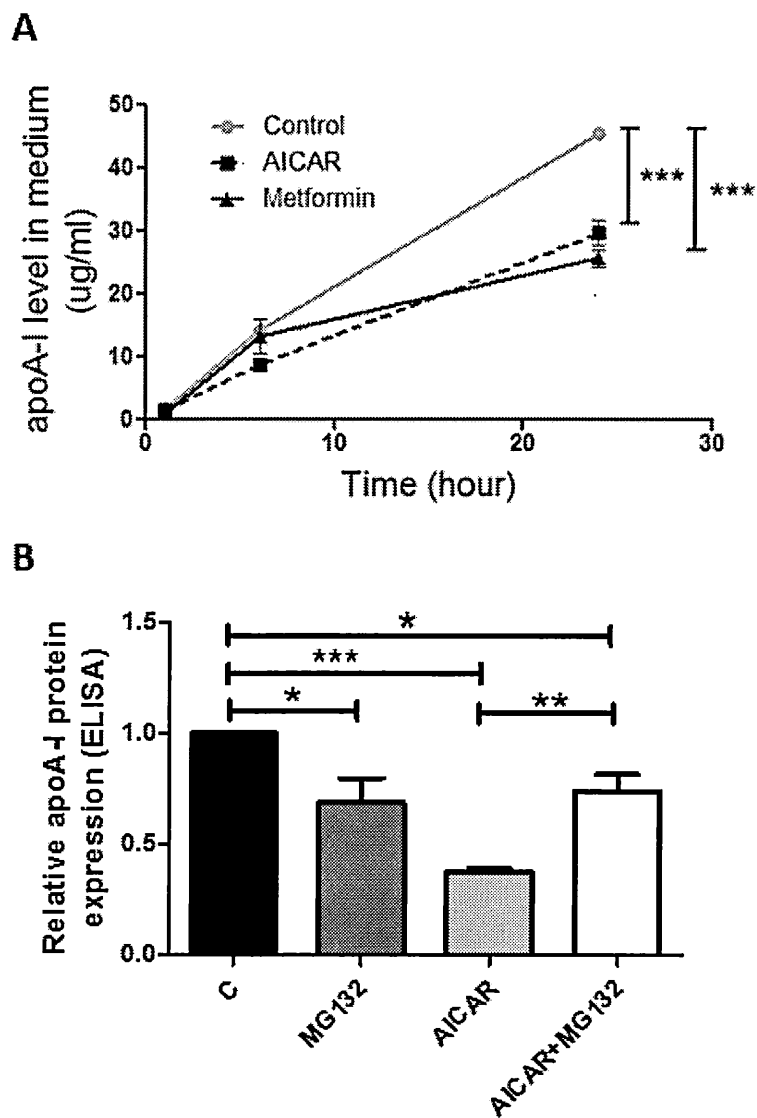


Figure 3.9 Effect of metformin, AICAR and MG132 on apoA-I cellular levels and secretion by HepG2 cells

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Notre étude avait pour but de déterminer le rôle de l'AMPK sur le métabolisme des lipoprotéines. Les recherches démontrent que l'activation de l'AMPK augmente les voies cataboliques de la cellule aux dépens des voies anaboliques. Par exemple, la phosphorylation de l'AMPK provoque la réduction de la synthèse du cholestérol et des TG par l'inhibition de l'HMG-CoA réductase (Henin et al, 1995) et de l'ACC (Davies et al, 1992) respectivement. En somme, nous avons démontré que l'activation de l'AMPK modifie le profil lipidique chez la souris et la captation globale ainsi que sélective des EC des LDL et des HDL dans les cellules HepG2. Ces modifications sont provoquées par la modification de l'expression de différents récepteurs tels que le rLDL, le SR-BI, le CD36 ainsi que leurs modulateurs respectifs. Nous avons aussi démontré que l'AICAR et la metformine provoquaient une diminution de l'apoA-I hépatique et des niveaux d'apoA-I dans le plasma ou le milieu de culture dans nos deux modèles.

Les modèles traités :

La souris, largement utilisée dans les études fondamentales, fut notre premier modèle d'étude. Elle permet d'avoir une vision complexe et large, le tout en permettant d'investiguer les effets des traitements d'un point de vue chronique et systémique. Il est important de signaler que la souris n'est malheureusement pas le meilleur modèle animal pour étudier les lipoprotéines puisque les niveaux en HDL et en LDL diffèrent des humains. D'abord, son niveau de CHOL-HDL est nettement supérieur, contrairement à celui du CHOL-LDL. D'ailleurs, c'est ce qui rend la souris très peu propice à l'athérosclérose comparativement à l'humain (Nasser et al, 2009). De plus, la souris ne possède pas la CETP, une protéine jouant un rôle essentiel dans le métabolisme des HDL et des VLDL (revu par Barter et al, 2003). Par contre, comme la souris est le modèle le plus utilisé dans les études fondamentales, il reste important de caractériser le métabolisme de ses lipoprotéines pour des études futures.

Les cellules HepG2, un modèle hautement accepté dans la communauté scientifique pour sa forte homologie avec les cellules hépatiques humaines, permettent plutôt de jeter un regard sur l'activation de l'AMPK à différents temps de traitements très courts. Ce modèle permet aussi de faire un lien plus étroit avec la régulation des lipoprotéines chez l'homme et d'étudier avec plus de profondeur des phénomènes préalablement observés avec, par exemple, l'ajout d'inhibiteurs et d'activateurs. Toutefois, ni les souris, ni les cellules HepG2 ne correspondent à un modèle parfait. D'abord, il s'agit d'un environnement *in vitro* ne permettant pas de mimer la réponse du corps humain dans son ensemble. Ensuite, les cellules HepG2 sont des cellules cancéreuses (permettant une division cellulaire accélérée) avec un génotype quelque peu modifié. Des articles comparant les cellules HepG2 avec des cultures primaires d'hépatocytes humains démontrent que certaines enzymes servant à la métabolisation de substances exogènes sont absentes ou moins abondantes chez les cellules HepG2 (Wilkening, Stahl and Bader, 2003). D'autres chercheurs ont aussi démontré que l'activité de la CYP450 diffère entre les cellules HepG2 et les cellules de foie humain (Gerets et al, 2012). Voilà pourquoi il est important de faire des études fondamentales à la fois dans un modèle humain *in vitro* et un modèle animal *in vivo*.

4.1 Effet de l'AICAR et de la metformine sur l'activation de l'AMPK

Chez la souris, nous avons démontré qu'un traitement journalier à l'AICAR et à la metformine avait pour effet une phosphorylation de l'AMPK (donc une activation) dans leurs cellules de foie. Ces résultats concordent avec ceux suggérés par l'équipe de Kim (2008) et celle de Jørgensen (2007).

Dans les cellules HepG2, les traitements phosphorylent significativement l'AMPK, et ce, sans modifier le niveau de sa forme non phosphorylée. Étonnamment, les deux drogues ne semblent pas activer l'AMPK de la même façon dans le temps. En effet, l'AICAR active la kinase de façon intense durant cinq à quinze minutes pour finalement la déphosphoryler par la suite. La metformine, quant à elle, active l'AMPK plus modestement jusqu'à 24 heures de traitement. Il est possible que l'effet plus rapide de l'AICAR s'explique par son activation plus directe sur l'AMPK. Effectivement,

l'AICAR, lorsqu'intériorisé par la cellule, va former un analogue d'AMP, le ZMP qui est capable d'activer allostériquement l'AMPK (Corton et al, 1995). La metformine agit plutôt indirectement en inhibant partiellement la chaîne de transport des électrons modifiant ainsi le ratio d'ATP/AMP, ce qui mènera à l'activation de l'AMPK (Owen et al, 2000). Un phénomène semblable fut rapporté dans des hépatocytes de rats par des travaux d'une équipe de chercheurs (Zhou et al, 2001). Ils ont démontré qu'à une dose constante (500 μ M), l'intensité de la phosphorylation de l'AMPK obtenue en une heure de traitement avec l'AICAR équivalait à sept heures de traitement avec la metformine. Une dose de 2000 μ M de metformine devait être utilisée pendant une heure afin d'obtenir des résultats similaires à 500 μ M d'AICAR (Zhou et al, 2001).

Il reste maintenant à comprendre pourquoi il y a une déphosphorylation de l'AMPK par l'AICAR avec ces traitements. Des études dans des cellules endothéliales microvasculaires de myocarde (MMEC) ont démontré une phosphorylation rapide de l'AMPK par l'AICAR, suivie d'une déphosphorylation après quatre heures de traitement (Ahluwalia et Tarnawski, 2011). De plus, un autre groupe de chercheurs a démontré qu'un traitement au palmitate sur des cellules musculaires squelettiques phosphorylait l'AMPK entre cinq à trente minutes suivi, encore une fois, d'une déphosphorylation (Pu et Liu, 2009). Il est possible qu'une fois l'AMPK activée, il y ait le déclenchement d'une cascade signalétique afin d'effectuer éventuellement la déphosphorylation de l'AMPK. Il pourrait ainsi s'agir d'un mécanisme d'autorégulation pour maintenir l'homéostasie de la cellule. Chose certaine, lorsque le ratio d'AMP/ATP est stabilisé à nouveau par l'activation de l'AMPK, des processus de déphosphorylation de la kinase, guidée par l'ATP, seront effectivement enclenchés (Xiao et al, 2011). Comme la metformine phosphoryle plus lentement l'AMPK que l'AICAR, il aurait probablement été possible de visualiser la déphosphorylation de la kinase seulement après des traitements supérieurs aux temps utilisés.

4.2 Effet de l'AMPK sur le métabolisme du cholestérol et des triglycérides

Les traitements chez les souris et dans les cellules HepG2 provoquent une diminution du niveau de cholestérol cellulaire. Il a maintes fois été démontré que l'activation de

l'AMPK inhibe l'HMG-CoA réd, ce qui expliquerait clairement cette diminution (Oliaro-Bosso et al, 2009). D'ailleurs, le niveau de l'HMG-CoA réd en protéine diminue en immunobuvardage chez la souris.

Pour ce qui est de l'effet sur le niveau de TG cellulaires, l'activation de l'AMPK provoque une diminution de celui-ci dans les souris traitées à l'AICAR et dans les cellules HepG2 traitées avec les deux produits. Cet effet est probablement causé par une phosphorylation de l'ACC suite à l'activation de l'AMPK comme décrit par l'équipe de Davies (1992). Étonnamment, les traitements à la metformine chez les souris n'ont aucun effet significatif sur le niveau de TG cellulaires. Nous avons observé par immunobuvardage, une forte augmentation de la forme phosphorylée de l'ACC seulement après un traitement à l'AICAR. Ceci pourrait, en partie, expliquer les différents niveaux de TG obtenus entre les deux drogues. De plus, la metformine ne semble pas avoir d'effet significatif sur le niveau total de l'ACC en immunobuvardage contrairement à l'AICAR qui entraîne une augmentation du niveau total de l'ACC. Le niveau de SREBP-1c suit d'ailleurs cette modulation, ce qui est logique puisque cette protéine est un régulateur positif connu de l'expression du gène de l'ACC (Hardie, 1989). Il est possible que la metformine agisse à la fois sur l'AMPK, mais aussi sur une autre voie de signalisation permettant l'augmentation de la captation cellulaire des TG par les cellules du foie de souris. Ceci expliquerait la non-parité entre les traitements à l'AICAR et ceux à la metformine. Toutefois, d'autres expériences seront nécessaires pour mieux comprendre cette différence.

4.3 Effet de l'AMPK sur le rLDL

Le niveau de rLDL chez la souris n'a démontré aucune modification significative après deux semaines de traitement. Comme les deux traitements augmentent le niveau de SREBP-2, nous nous attendions à une augmentation de l'ARNm du rLDL. Cette augmentation fut seulement visible après un traitement à l'AICAR. Il est possible que la dose utilisée pour la metformine n'était pas suffisante pour activer la synthèse du rLDL

puisque'il est connu que l'AICAR agit quatre fois plus intensément que la metformine sur l'activation de l'AMPK (Zhou et al, 2001).

Tel qu'initialement prévu, les cellules HepG2 traitées avec l'AICAR et la metformine, contrairement aux cellules de foie de souris, présentent une augmentation du niveau de rLDL. Le même phénomène est modestement visible sur le niveau d'ARNm du rLDL, ce qui concorde aux résultats de l'équipe de Wang (2008). Comme nous avons démontré que l'activation de l'AMPK augmente le niveau de SREBP-2, il est possible que la hausse du rLDL découle de cette augmentation. En effet, la SREBP-2 est connue pour être un régulateur positif du rLDL (Goldstein et Brown, 1997). De plus, la diminution du cholestérol causée par l'inhibition de l'HMG-CoA réductase peut potentiellement augmenter l'activité de la SREBP-2. En effet, une déficience en stérol provoque la maturation des SREBP leur permettant de pénétrer dans le noyau afin d'accéder aux gènes cibles (Brown et Goldstein, 1997).

Bien que l'ARNm du rLDL des cellules HepG2 augmente légèrement après les traitements, elle ne semble pas être suffisante pour expliquer la forte augmentation du niveau protéique du rLDL. En sachant que la forme plasmatique du PCSK9 est connue pour engendrer la dégradation du rLDL (Maxwell et al, 2004 & 2005), nous avons émis l'hypothèse que le niveau de PCSK9 dans le milieu de culture cellulaire traité diminuerait, augmentant ainsi le nombre de rLDL. En effet, les résultats démontrent une diminution de PCSK9 de 71% pour l'AICAR et de 34% (p-value < 0,05) pour la metformine dans le milieu après 24 heures de traitement. Bref, l'augmentation de l'ARNm du rLDL couplée avec la diminution du PCSK9 explique l'augmentation du niveau rLDL dans la cellule HepG2.

La différence de modulation du rLDL entre la souris et les cellules HepG2 reste mystérieuse. Comme la SREBP-2 est aussi un élément de régulation positif du PCSK9 (Horton et al, 2007), nous sommes allés voir le niveau de PCSK9 hépatique chez la souris. Les résultats démontrent une augmentation du taux de transcrits pour la PCSK9 par les deux traitements. Comme la PCSK9 hépatique est un précurseur de la PCSK9 plasmatique, il est possible que sa hausse augmente la dégradation du rLDL compensant de ce fait pour l'augmentation de son ARNm. Ainsi, la SREBP-2 augmenterait à la fois la

synthèse du rLDL (Horton et al, 1998; Castoreno, 2005), mais aussi sa dégradation via PCSK9, gardant ainsi inchangé le niveau de rLDL.

4.4 Effet de l'AMPK sur SR-BI

L'AICAR et la metformine réduisent le niveau de SR-BI au niveau transcriptionnel chez les souris et après 24 heures de traitement dans les cellules HepG2. PDZK1 est un élément de régulation qui augmente la stabilité et la translocation de SR-BI vers les membranes cellulaires (revu par Leiva et al, 2011). Malheureusement, aucune modification ne fut notable dans le niveau protéique de PDZK1. Bien que plusieurs autres voies de signalisation puissent influencer l'expression de SR-BI, une stimulation de la voie p38 MAPK démontre un effet réducteur sur la synthèse de SR-BI (Murao et al, 2008). Étant donné que l'AMPK stimule cette voie (Xi et al, 2001), nous pourrions émettre comme hypothèse que l'AMPK agit sur SR-BI à travers une régulation de la voie p38 MAPK.

4.5 Effet de l'AMPK sur la captation globale des LDL et HDL

La modulation des récepteurs dans les foies de souris, nous a poussés à faire des essais de clairance des LDL et HDL. Malheureusement, aucun résultat significatif ne fut visible pour les essais de captation globale pour les LDL ou les HDL, probablement causé par un nombre d'expériences insuffisant.

Il fut démontré que la metformine diminue le CHOL-LDL plasmatique chez des humains DT2 (diabète de type 2) (Bolen et al, 2007 ; Salpeter et al, 2008). Nous avons investigué si la hausse du rLDL dans les cellules HepG2 s'accompagne d'une augmentation de la captation globale du LDL. En effet, l'activation de l'AMPK avec l'AICAR augmente significativement la dégradation globale de la LDL, corrélant ainsi avec les résultats de Wang et al, (2008) dans les mêmes cellules. La diminution observée par l'équipe de Bolen pourrait donc être attribuée à une augmentation du nombre de rLDL par l'activation de l'AMPK à la metformine, diminuant ultimement la quantité de CHOL-

LDL plasmatique. Comme pour la LDL, la captation globale de la HDL est aussi augmentée à la suite de l'activation de l'AMPK. Bien que ce volet n'ait pas été investigué, il est possible de croire que les traitements influencent l'activité du récepteur P2Y13, un récepteur potentiel jouant un rôle clé dans la captation globale de la HDL (Fabre et al, 2010).

4.6 Effet de l'AMPK sur la captation sélective des EC des LDL et HDL

Nous avons aussi étudié l'effet possible de la diminution de SR-BI sur la captation sélective des EC des LDL et HDL dans nos deux modèles. Les expériences de clairance des HDL démontrent une réduction de leur captation sélective significative corrélant parfaitement avec la réduction de la quantité de SR-BI. Aucun résultat ne fut significatif pour les essais de clairance en captation sélective des LDL, et ce, probablement pour les mêmes raisons que celles mentionnées ci-haut.

Malgré la baisse franche de la protéine du SR-BI, on observe que l'activation de l'AMPK par l'AICAR augmente la captation sélective à la fois pour les LDL (augmentation de 42,0%) et les HDL (augmentation de 68,9%) dans les cellules.

L'augmentation observée pour le CD36, un autre récepteur capable de faire de la captation sélective sur ces deux classes de lipoprotéines (Brunner et al, 2011 ; Luangrath et al, 2008), pourrait en partie expliquer ces résultats. En effet, notre laboratoire a déjà suggéré une hausse de l'activité de CD36 sur la LDL dans un modèle de souris SR-BI KO (Luangrath et al, 2008). Il serait possible que la réduction de SR-BI par l'AMPK soit compensée par une augmentation de la synthèse du CD36. D'ailleurs, les résultats en western blot chez la souris et dans les cellules HepG2 démontrent une augmentation du CD36. Dans la littérature, il est déjà démontré que l'activation de l'AMPK induit le recrutement du CD36 sarcolemme, soit une membrane entourant le cytoplasme des cellules musculaires (Glatz, Luiken and Bonen, 2010).

Il ne reste plus qu'à comprendre si cette augmentation est un résultat direct de l'activation de l'AMPK ou plutôt une conséquence de la diminution du SR-BI. D'autres expériences sont à prévoir pour davantage comprendre ce phénomène.

Bien que le CD36 puisse partiellement agir sur la captation sélective des EC, il est connu que l'activité du SR-BI est bien plus grande que celle de ce dernier (Connelly et al, 1999). L'augmentation de CD36 ne peut donc pas expliquer à elle seule l'augmentation de la captation sélective des EC, de la LDL et de la HDL à la suite de l'activation de l'AMPK. Comme le SR-BI membranaire est probablement la fraction la plus importante pour effectuer de la captation sélective, son niveau fut mesuré par microscopie confocale. Les analyses démontrent effectivement une augmentation du SR-BI en surface membranaire, malgré une diminution de la quantité de protéine totale par immunobuvardage. Ces résultats couplés avec la hausse du CD36 peuvent facilement expliquer l'augmentation de la captation sélective des EC des lipoprotéines. PDZK1 aurait pu expliquer la translocation de SR-BI vers la surface (Kocher et al, 2003), mais aucune modification sur son niveau protéique n'était visible. Il est donc possible que l'AICAR agisse simplement sur l'activité de PDZK1 plutôt que sur son expression.

4.7 Effet de l'activation de l'AMPK sur le profil lipidique de la souris

Nos recherches chez la souris démontrent que l'activation de l'AMPK provoque une hausse du CHOL des lipoprotéines à apoB, probablement causée par une augmentation du CHOL-LDL. La diminution de l'expression du SR-BI, couplée avec un niveau de rLDL inchangé, chez les souris traitées, pourrait expliquer le niveau accru de CHOL-LDL plasmatique. Fait intéressant, nous avons trouvé des niveaux plus élevés du variant d'épissage SR-BII chez les animaux traités avec l'AICAR et la metformine. Il est toutefois connu que cette forme est beaucoup moins active sur la captation sélective que SR-BI (Eckhardt et al, 2004). Ce n'est d'ailleurs pas la première fois qu'une régulation antiparallèle est observée entre ces deux formes. En effet, il a été signalé que les œstrogènes réduisent le niveau de SR-BI tout en régulant à la hausse celui de SR-BII (Zhang et al, 2007).

Bien qu'une réduction de l'expression du SR-BI se traduise généralement par une augmentation du HDL-CHOL plasmatique (Rigotti et al, 1997), celui-ci fut diminué chez les souris traitées. D'ailleurs, des essais de clairance démontrent que les HDL subissent

davantage de captation sélective, ne corrélant pas avec la réduction du SR-BI lorsque l'AMPK est activée. Par conséquent, l'AICAR et la metformine doivent agir sur une autre voie métabolique influençant le niveau de CHOL-HDL dans le sang. Nous avons donc investigué le niveau du transporteur ABCA1 qui joue un rôle clé dans la synthèse du HDL. Bien que la réduction en protéines d'ABCA1 chez les souris traitées avec de la metformine pourrait expliquer en partie les niveaux inférieurs du CHOL-HDL, la hausse d'ABCA1 chez les souris traitées à l'AICAR suggère le contraire. Il semble donc y avoir un autre effet de l'activation de l'AMPK pouvant expliquer la modulation du CHOL-HDL.

4.8 Effet de l'AMPK sur la synthèse des HDL

Comme mentionné précédemment, la formation de HDL dépend intimement de la synthèse et de la sécrétion de l'apoA-I à partir des hépatocytes. De façon intéressante, nos résultats obtenus dans les foies de souris, suggère fortement une diminution transcriptionnelle du gène de l'HNF4 α après l'activation de l'AMPK. D'ailleurs, la théorie suggère déjà l'existence de ce phénomène dans les foies de rats (Leclerc et al, 2001). Comme l'HNF4 α est connu pour être un régulateur positif de l'expression du gène de l'apoA-I (Chan et al, 1993), il semble logique d'observer une nette diminution du niveau en protéines et en ARNm de cette apolipoprotéine chez les souris traitées après l'activation de l'AMPK. Ce résultat corrèle aussi avec une diminution de l'apoA-I plasmatique mesurée en ELISA après traitement à l'AICAR et à la metformine. Ainsi, l'effet de l'AMPK sur l'apoA-I explique probablement la diminution en CHOL-HDL plasmatique en sachant que le niveau de l'expression de l'apoA-I hépatique influence son niveau de sécrétion ainsi que la synthèse des HDL (Sorci-Thomas et al, 1989).

Nous avons aussi voulu vérifier si le phénomène observé chez la souris était le même que dans les cellules HepG2. Effectivement, les deux produits réduisent le niveau de protéines apoA-I de façon dépendante au temps dans les cellules HepG2. Étonnamment, la modulation de l'ARNm de l'apoA-I corrèle seulement avec sa modulation en protéines dans les cellules traitées à la metformine. L'AICAR montre, au contraire, une

augmentation de l'ARNm de l'apoA-I. Tout comme chez la souris, la metformine agit probablement par le HNF4 α pour moduler l'apoA-I (Leclerc et al, 2001). Comme mentionné plus haut, il est déjà bien établi que l'expression de ce facteur est réduite par l'AMPK (Hong et al, 2003).

Il a été suggéré que l'apoA-I peut être dégradée par la voie protéasomale dans des cellules artérielles pulmonaires (Anjum et al, 2013). De plus, il a été démontré que l'AICAR est capable d'inverser une inhibition de cette même voie (Chotechuan et al, 2011). Nous avons donc supposé que l'AICAR réduit le niveau d'apoA-I, en inhibant sa dégradation par le protéasome. En effet, lorsque les cellules HepG2 sont traitées à la fois avec l'AICAR et le MG132, un inhibiteur de la voie protéasomale, le niveau d'apoA-I augmente comparativement à celui des cellules traitées avec l'AICAR seul. De façon inattendue, lorsque les cellules sont traitées seulement avec le MG132, leur niveau est inférieur à celui des cellules HepG2 contrôles malgré une diminution de l'activité du protéasome. Il est connu que le FXR est un facteur nucléaire capable d'inhiber l'expression du gène de l'apoA-I (Claudel et al, 2002). De plus, lorsqu'il est exposé au MG132, son niveau augmente, car il est normalement dégradé par la voie du protéasome (Kemper et al, 2009). Par conséquent, nous supposons qu'une exposition au MG132 seul, réduit le niveau de l'apoA-I en inhibant sa synthèse et ce, malgré une l'inhibition du protéasome. Par contre, comme les résultats le montrent, un traitement à l'AICAR aura comme effet d'augmenter la portion d'apoA-I dégradée par le protéasome. Il est donc possible que lorsque les cellules sont exposées à l'AICAR et au MG132, la régulation positive de l'inhibition du protéasome devienne plus importante que la régulation négative par la FXR résultant en une augmentation nette de l'apoA-I cellulaire.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Chez la souris, nous avons constaté une augmentation du CHOL-lipoprotéine-apoB, probablement causée par une augmentation du CHOL-LDL. Ce résultat semble corrélérer avec une diminution de l'expression de SR-BI couplée avec un niveau inchangé du rLDL. Étonnamment, l'AICAR augmente l'ARNm codant pour le rLDL, sans en changer la quantité en protéines. Ceci semble être attribué à une augmentation du PCSK9, un régulateur positif de la dégradation du rLDL. Tous ces résultats coïncident avec une augmentation de SREBP-2, un élément de réponse de PCSK9 et du rLDL (Horton et al, 1998-2007). De façon surprenante, la diminution de CHOL-HDL retrouvée ne corrèle pas avec la diminution de SR-BI. Par contre, nos résultats démontrent une forte diminution de l'apoA-I, une apolipoprotéine clé dans la synthèse des HDL. Bref, la diminution du CHOL-HDL serait causée par une réduction de sa synthèse via une diminution de l'expression de l'apoA-I. Du point de vue thérapeutique, il semble que l'activation de l'AMPK soit néfaste chez la souris, car le CHOL-LDL augmente et le CHOL-HDL diminue. Nos résultats ne concordent pas avec ceux de Bolen et al (2007). Il est possible que la modulation des lipoprotéines diffère selon l'espèce.

Pour ce qui est de nos résultats sur le modèle de cellules HepG2, l'augmentation de la captation globale des LDL semble être causée par une augmentation du rLDL. Bien que l'ARNm du rLDL augmente légèrement après activation de l'AMPK, seul, ce phénomène n'explique pas la forte augmentation du rLDL au niveau protéique. La PCSK9 dans le milieu de culture des cellules diminue grandement à la suite d'un traitement. Ce phénomène peut expliquer à la fois l'augmentation du rLDL, mais aussi les divergences dans les résultats obtenus entre les cellules HepG2 et les foies de souris pour le rLDL. Résultats surprenants, la quantité totale en SR-BI diminue, ce qui ne corrèle pas avec une augmentation de la captation sélective des EC des HDL et des LDL. Bien que le niveau de CD36 augmente à la suite d'un traitement, son activité par rapport à SR-BI n'est certainement pas suffisante pour justifier une augmentation de l'activité de la captation sélective. De façon intéressante, nous avons obtenu par analyse confocale qu'à la suite

d'un traitement, une augmentation de la fraction de SR-BI présente sur la surface cellulaire était observée, expliquant ainsi l'augmentation de la captation sélective. Comme chez les souris, les deux traitements réduisent le niveau en apoA-I dans les cellules HepG2 de même que secrété. Par contre, bien que la metformine diminue l'ARNm codant pour l'apoA-I, l'AICAR semble plutôt réduire son niveau en protéine en augmentant sa dégradation par la voie du protéasome.

Finalement, les résultats avec les cellules HepG2 semblent très prometteurs. En effet, le groupe de Bolen a démontré que les patients DT2 traités à la metformine présentaient une réduction de leur CHOL-LDL plasmatique (Bolen et al, 2007). Ces résultats corrént fortement avec une augmentation du rLDL et la translocation du SR-BI en surface cellulaire dans les cellules HepG2 après activation de l'AMPK. De plus, nous avons démontré que la captation globale et sélective des EC des LDL augmente à la suite d'un traitement à l'AICAR. Bref, la modulation du rLDL et de SR-BI par l'activation de l'AMPK semble être une bonne cible thérapeutique pour le patient montrant un taux de CHOL-LDL plasmatique élevé. Il reste maintenant à comprendre quel sera l'impact de la diminution de la synthèse de l'apoA-I par l'AMPK sur le niveau en CHOL-HDL dans un modèle systémique humain.

Perspectives futures

En premier lieu, il serait important d'investiguer l'augmentation de la captation globale des HDL par l'activation de l'AMPK avec l'AICAR. Plusieurs éléments pourraient être la cause de cette modulation, comme une hausse de l'activité ou de l'expression du récepteur P2Y13, un récepteur potentiellement impliqué dans la captation globale du HDL (Fabre et al, 2010). Ceci pourrait aussi être une seconde explication de la diminution des niveaux de CHOL-HDL dans le plasma des souris traitées.

Ensuite, il serait sage de mesurer le rôle que joue l'augmentation du CD36 sur la captation sélective des LDL et des HDL lors de l'activation de l'AMPK. L'utilisation d'un siARN CD36 couplé à des essais de captation sélective dans les deux modèles permettrait de répondre à cette question.

Une différence majeure obtenue entre les deux modèles, après l'activation de l'AMPK, fut la régulation de PCSK9. En effet, chez la souris, celle-ci semblait être augmentée dans les cellules hépatiques, tandis que dans les cellules HepG2, nous avons une diminution de PCSK9 dans le milieu. De plus, cette différence de modulation influence directement la quantité du rLDL à la suite d'un traitement. Pour l'instant, il n'y a aucune autre étude qui rapporte une différence dans la régulation de PCSK9 entre les modèles murins *in vivo* et humain *in vitro*. Il est possible que l'activation de l'AMPK agisse sur différents régulateurs positifs de PCSK9 de manières différentes selon l'espèce. Plus d'investigations restent à accomplir pour élucider le phénomène.

Finalement, il serait intéressant de mettre au point un modèle plus adéquat pour l'étude de l'effet l'activation de l'AMPK sur le métabolisme des lipoprotéines. Nous proposons l'utilisation de souris humanisées afin de tester nos traitements sur un modèle systémique se rapprochant davantage à l'homme. Le candidat idéal serait les souris surexprimant l'apoB et exprimant la CETP humaine. De plus, le modèle murin athérosclérotique apoE KO permettrait de vérifier si l'AMPK activée engendre une régression de la formation d'athéromes dans les artères.

5.1 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acton, S. L., Rigotti, A., Landschultz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H. and Krieger, M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271: 518-520.

Ahluwalia, A. and Tarnawski, A. S. 2011. Activation of the metabolic sensor-AMP activated protein kinase reverses impairment of angiogenesis in aging myocardial microvascular endothelial cells. Implications for the aging heart. *J Physiol Pharmacol.* 62: 583-587.

Akram, O. N., Bernier, A., Petrides, F., Wong, G. and Lambert, G. 2010. Beyond LDL cholesterol, a new role for PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30: 1279-1281.

Alexander, E. T., Vedhachalam, C., Sankaranarayanan, S., de la Llera-Moya, M., Rothblat, G. H., Rader, D. J. and Phillips, M. C. 2011. Influence of apolipoprotein A-I domain structure on macrophage reverse cholesterol transport in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31: 320-327.

Anjum, F., Lazar, J., Soh, J., Albitar, M., Gowda, S., Hussain, M. M. and Wadgaonkar, R. 2013. Dysregulation of ubiquitin-proteasome pathway and apolipoprotein A metabolism in sickle cell disease-related pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ.* 3: 851-855.

Aubert, R., M. C. Camus, F. Bourgeois, J. Herzog, and D. Lemonnier. 1988. Serum lipoprotein profiles in mice: effects of early over- and undernutrition. *J Nutr.* 118: 1190-1196.

Austin, M. A., King, M. D., Vranizan, K. M., Newman, B. and Krauss, R. M. 1988. Inheritance of low density lipoprotein subclass patterns: Results of complex segregation analysis. *Am J Hum Genet.* 43: 838-846.

Asztalos, B. F., Schaefer, E. J., Horvath, K. V., Yamashita, S., Miller, M., Franceschini, G. and Calabresi, L. 2007. Role of LCAT in HDL remodeling: investigation of LCAT deficiency states. *J Lipid Res.* 48: 592-599.

Barrans, A., Collet, X., Barbaras, R., Jaspard, B., Manent, J., Vieu, C., Chap, H. and Perret, B. 1994. Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J Biol Chem.* 269: 11572-11577.

Baranova, I. N. Vishnyakova, T. G., Bocharov, A. V., Leelahavanichkul, A., Kurlander, R., Chen, Z., Souza, A. C. P. Yuen, P. S. T. Star, R. A., Csako, G., Patterson, A. P. and Eggerman, T. L. 2012. Class B scavenger receptors SR-BI/BII and

CD36 mediate bacterial recognition and pro-inflammatory signaling induced by *E.coli*, lipopolysaccharide and cytosolic chaperonin 60. *J Immunol.* 188: 1371-1380.

Barter, P. J. and Rye, K. A. 2012. Cholesteryl ester transfer protein inhibition as a strategy to reduce cardiovascular risk. *J Lipid Res.* 53: 1755-1766.

Barter, P. J. and Rye, K. A. 2014. Regulation of High-Density Lipoprotein Metabolism. *Circ Res.* 114: 124-142.

Barter, P. J., Brewer, H. B. JR., Chapman, M. J., Hennekens, C. H., Rader, D. J. and Tall, A. R. 2003. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 160-167.

Barter, P. J., Hopkins, G. J. and Calvert G. D. 1982. Transfers and exchanges of esterified cholesterol between plasma lipoproteins. *J Biochem.* 208: 1-7.

Bateman, A. 1997. The structure of a domain common to archaebacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci.* 22: 12-13.

Berneiss, K. K. and Krauss, R. M. 2002. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res.* 43: 1363-1379.

Bianchi, A., Evans, J. L., Iverson, A. J., Nordlund, A. C., Watts, T. D. and Witters, L. 1990. Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem.* 265: 1502-1509.

Blanche, P. J., Gong, E. L., Forte, T. M. and Nichols, A. V. 1981. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta.* 665: 408-419.

Bogachus, L. D. and Turcotte, L. P. 2010. Genetic downregulation of AMPK-alpha isoforms uncovers the mechanism by which metformin decreases FA uptake and oxidation in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299: 1549-1561.

Bolen, S., Feldman, L., Vassy, J., Wilson, L., Yeh, H.C., Marinopoulos, S., Wiley, C., Selvin, E., Wilson, R., Bass, E. B. and Brancati, F. L. 2007. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 147: 386-399.

Brewer, H. B. Jr, Sprecher, D. L., Gregg, R. E. and Hoeg, J. M. 1985. Risk factors for the development of premature cardiovascular disease. *Adv Exp Med Biol.* 183: 27-36.

Brissette, L., M.-C. Charest, and L. Falstraalt. 1996. Selective uptake of cholesteryl esters of low-density lipoproteins is mediated by the lipoprotein-binding site in HepG2 cells and is followed by the hydrolysis of cholesteryl esters. *Biochem J.* 318: 841-847.

Brodeur, M. R., Bourret, G., Faltrault, L. and Brissette, L. 2005. Physiological importance of SR-BI in the *in vivo* metabolism of human HDL and LDL in male and female mice. *J Lipid Res.* 46: 687-696.

Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1974. Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *J Biol Chem.* 249: 7306-7314.

Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1976. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 191: 150-154.

Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1983. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 52: 223-261.

Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47.

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., Kovanen P. T. and Goldstein, J. L. 1979. Receptor-mediated uptake of lipoprotein cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Recent Prog Horm Res.* 35: 25-57.

Brundert, M., Heeren, J., Merkel, M., Carambia, A., Herkel, J., Groitl, P., Dobner, T., Ramakrishnan, R., Moore, K. J. and Rinninger, F. 2011. Scavenger receptor CD36 mediates uptake of high density lipoproteins in mice and by cultured cells. *J Lipid Res.* 52: 745-758.

Calabresi, L., Pisciotta, L. and Costantin, A. 2005. The molecular basis of lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency syndromes: a comprehensive study of molecular and biochemical findings in 13 unrelated Italian families. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25: 1972-1978.

Castoreno, A. B., Wang, Y., Stockinger, W., Jarzylo, L. A., Du, H., Pagnon, J. C., Shieh, E. C. and Nohturfft, A. 2005. Transcriptional regulation of phagocytosis-induced membrane biogenesis by sterol regulatory element binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 13129-13134.

Chan, J., Nakabayashi, H. and Wong, N. C. 1993. HNF-4 increases activity of the rat Apo A1 gene. *Nucleic Acids Res.* 21: 1205-1211.

Chotechuang, N., Azzout-Marniche, D., Bos, C., Chaumontet, C., Gaudichon, C. and Tomé, D. 2011. Down-regulation of the ubiquitin-proteasome proteolysis system by amino acids and insulin involves the adenosine monophosphate-activated protein kinase

and mammalian target of rapamycin pathways in rat hepatocytes. *Amino Acids*. 41: 457-468.

Claudel, T., Sturm, E., Duez, H., Torra, I. P., Sirvent, A., Kosykh, V., Fruchart, J. C., Dallongeville, J., Hum, D. W., Kuipers, F. and Staels, B. 2002. Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest*. 109: 961-971.

Clay, M. A., Newnham, H. H. and Barter, P. J. 1991. Hepatic lipase promotes a loss of apolipoprotein A-I from triglyceride-enriched human high density lipoproteins during incubation in vitro. *Arterioscler Thromb*. 11: 415-422.

Connelly, M. A., Klein, S. M., Azhar, S., Abumrad, N. A. and Williams, D. L. 1999. Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J Biol Chem*. 274: 41-47.

Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A. and D. G. Hardie. 1995. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem*. 229: 558-565.

Costet, P., Krempf, M. and Cariou, B. 2008. PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem Sci*. 33: 426-434.

Coughlan, K. A., Valentine, R. J., Ruderman, N. B. and Saha, A. K. 2014. AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes Metab Syndr Obes*. 7: 241-253.

Cushman, S., Goodyear, L., Pilch, P., Ralston, E., Galbo, H., Ploug, T., Kristiansen, S. R. and Klip, A. 1998. Molecular mechanisms involved in GLUT4 translocation in muscle during insulin and contraction stimulation. *Adv Exp Med Biol*. 441: 63-71.

Davies, S. P., Carling, D., Munday M. R. and Hardie, D. G. 1992. Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets. *Eur J Biochem*. 203: 615-623.

Davies, S. P., Helps, N. R., Cohen, P. T. and Hardie, D. G. 1995. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett*. 377: 421-425.

Davignon, J., Dubuc, G. and Seidah, N. G. 2010. The influence of PCSK9 polymorphisms on serum low-density lipoprotein cholesterol and risk of atherosclerosis. *Curr Atheroscler*. 12: 308-315.

De Beer, M. C., Durbin, D. M., Cai, L., Jonas, A., de Beer, F.C. and van der Westhuyzen, D. R. 2001. Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI. *J Lipid Res.* 42: 309-313.

Dentin, R., Pégrier, J. P., Benhamed, F., Foufelle, F., Ferré, P., Fauveau, V., Magnuson, M. A., Girard, J. and Postic, C. 2004. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem.* 279: 20314-20326.

Do, R. Q., Nicholls, S. J. and Schwartz, G. G. 2014. Evolving targets for lipid-modifying therapy. *EMBO Mol Med.* 6: 1215-1230.

Dong, B., M. Wu, H. Li, F. B. Kraemer, K. Adeli, N. G. Seidah, S. W. Park, and J. Liu. 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.

Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P. and Foufelle, F. 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86: 839-848.

Eckhardt, E.R., Cai, L., Sun, B., Webb, N.R. and van der Westhuyzen, D.R. 2004. High density lipoprotein uptake by scavenger receptor SR-BII. *J Biol Chem.* 279: 14372-14381.

Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., Mair, W., Vasquez, D. S., Joshi, A., Gwinn, D. M., Taylor, R., Asara, J. M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., Kundu, M., Hansen, M. and Shaw, R. J. 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331: 456-461.

Fabre, A. C., Malaval, C., Ben Addi, A., Verdier, C., Pons, V., Serhan, N., Lichtenstein, L., Combes, G., Huby, T., Briand, F., Collet, X., Nijstad, N., Tietge, U.J., Robaye, B., Perret, B., Boeynaems, J. M. and Martinez, L. O. 2010. P2Y13 receptor is critical for reverse cholesterol transport. *Hepatology* 52: 1477-1483.

Fisher, E. A., Feig, J. E., Hewing, B., Hazen, S. L. and Smith, J. D. 2012. High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32: 2813-2820.

Fisslthaler, B., Fleming, I., Keserü, B., Walsh, K. and Busse, R. 2007. Fluid shear stress and NO decrease the activity of the hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase in endothelial cells via the AMP-activated protein kinase and FoxO1. *Circ Res.* 100: 12-21.

Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane-Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226: 497-509.

Foretz, M., Hébrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F. and Viollet, B. 2010. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest.* 120: 2355-2369.

Forte, T., Norum, K. R., Glomset, J. A., Nichols, A. V. 1971. Plasma lipoproteins in familial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency: structure of low and high density lipoproteins as revealed by electron microscopy. *J Clin Invest.* 50: 1141-1148.

Fullerton, M. D., Galic, S., Marcinko, K., Sikkema, S., Pulinilkunnil, T., Chen, Z. P., O'Neill, H. M., Ford, R. J., Palanivel, R., O'Brien, M., Hardie, D. G., Macaulay, S. L., Schertzer, J. D., Dyck, J. R., van Denderen, B. J., Kemp, B. E. and Steinberg, G. R. 2013. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat Med.* 19: 1649-1654.

Gerest, H. H. J., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Depelchin, B. O., Dhalluin, S. and Atienzar, F. A. 2012. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol.* 28: 69-87.

Gillard, B. K., Lin, H. Y., Massey, J. B. and Pownall, H. J. 2009. Apolipoproteins A-I, A-II and E are independently distributed among intracellular and newly secreted HDL of human hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 1791: 1125-1132.

Glass, C., Pittman, R. C., Weinstein, D. B. and Steinberg, D. 1983. Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80: 5435-5439.

Glatz, J. F. C., Luiken, J. F. P. and Bonen, A. 2010. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev.* 90: 367-417.

Goldstein, J. L. and Brown, M. S. 1974. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 249: 5153-5162.

Goldstein, J. L. and Brown, M. S. 2009. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29: 431-438.

Goldstein, J. L., Anderson, R. W. G. and Brown, M. S. 1979. Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279: 679-685.

Greenwalt, D. E., Lipsky, R. H., Ockenhouse, C. F., Ikeda, H., Tandon, N. N. and Jamieson, G. A. 1992. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction and transfusion medicine. *Blood* 80: 1105-1115.

Grossman, A. B., Korbonits, M., Kola, B., Boscaro, M., Rutter, G. A., Kola, B. and Boscaro, M. 2006. Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab.* 17: 205-215.

Guigas, B., Bertrand, L., Taleux, N., Foretz, M., Wiernsperger, N., Vertommen, D., Andreelli, F., Viollet, B. and Hue, L. 2006. 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-1- β -D-Ribofuranoside and Metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation. *Diabetes* 55: 865-874.

Gwang-woong, G. and Arya, M. 2012. Low-Density Lipoprotein Receptor (LDLR) Family Orchestrates Cholesterol Homeostasis. *Yale J Biol Med.* 85: 19-28.

Habegger, K. M., Hoffman, N. J., Ridenour, C. M., Brozinick, J. T. and Elmendorf, J. S. 2012. AMPK enhances insulin-stimulated GLUT4 regulation via lowering membrane cholesterol. *Endocrinology* 153: 2130-2141.

Halcox, J. P.J. and Deanfield, J. E. 2004. Beyond the laboratory ; Clinical implications for statin pleiotropy. *Circulation.* 109: II-42-II-48.

Han, R., Lai, R., Ding, Q., Wang, Z., Luo, X., Zhang, Y., Cui, G., He, J., Liu, W. and Chen, Y. 2007. Apolipoprotein A-I stimulates AMP-activated protein kinase and improves glucose metabolism. *Diabetologia* 50: 1960-1968.

Hara, A., Radin, N. S. 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem.* 90: 420-426

Hara, H. and Yokoyama, S. 1991. Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J Biol Chem.* 266: 3080-3086.

Hardie, D. G. 1989. Regulation of fatty acid synthesis via phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase. *Prog Lipid Res.* 28: 117-146.

Hardie, D. G. 2011. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor with a key role in metabolic. *Biochem Soc Trans.* 39: 1-13.

Hardie, D. G. and Pan, D. A. 2002. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated. *Biochem Soc Trans.* 30: 1064-1070.

Hatch, F. T., and R. S. Lees. 1968. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv Lipid- Res.* 6: 1-68.

Hayek, T., Chajek-Shaul, T., Walsh, A., Agellon, L. B., Moulin, P., Tall, A. R. and Breslow, J. L. 1992. An interaction between the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and apolipoprotein A-I genes in transgenic mice results in a profound CETP-mediated depression of high density lipoprotein cholesterol levels. *J Clin Invest.* 90: 505-510.

Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Makela, T. P., Alessi, D. R. and Hardie, D. G. 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol.* 2: 28.

He, G., Gupta, S., Yi, M., Michaely, P., Hobbs, H. H. and Cohen, J. C. 2002. ARH is a modular adaptor protein that interacts with the LDL receptor, clathrin, and AP-2. *J Biol Chem.* 277: 44044-44049.

Heijboer, A. C., Donga, E., Voshol, P. J., Dang, Z. C., Havekes, L. M., Romijn, J. A. and Corssmit, E. P. 2005. Sixteen hours of fasting differentially affects hepatic and muscle insulin sensitivity in mice. *J Lipid Res.* 46: 582-588.

Henin, N, Vincent, M.F., Gruber, H.E. and Van den Berghe, G. 1995. Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *FASEB J.* 9: 541-546.

Henriksen, B. S., Curtis, M. E., Fillmore, N., Cardon, B. R., Thomson, D. M. and Hancock, C. R. 2013. The effects of chronic AMPK activation on hepatic triglyceride accumulation and glycerol 3-phosphate acyltransferase activity with high fat feeding. *Diabetol Metab Syndr.* 31: 5-29.

Hong, Y. H., Varanasi, U. S., Yang, W. and Leff, T. 2003. AMP-activated protein kinase regulates HNF4 transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *J Biol Chem.* 278: 27495-27501.

Horton, J. D., Cohen, J. C. and Hobbs, H. H. 2007. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 32: 71-77.

Horton, J. D., Shimomura, I., Brown, M. S., Hammer, R. E., Goldstein, J. L. and Shimano, H. 1998. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin invest.* 101: 2331-2339.

Hurley, R. L., Anderson, K. A., Franzone, J. M., Kemp, B. E., Means, A. R. and Witters, L. A. 2005. The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem.* 280: 29060-29066.

Ikemoto, M., Arai, H., Feng, D., Tanaka, K., Aoki, J., Dohmae, N., Takio, K., Adachi, H., Tsujimoto, M. and Inoue, K. 2000. Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 6538-6543.

Innerarity, T. L. and Mahley, R. W. 1978. Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. *Biochemistry* 17: 1440-1447.

Ishibashi, S., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Gerard, R. D., Hammer, R. E. and Herz, J. 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*. 92: 883-893.

Istvan, E. S. and Deisenhofer, J. 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292: 1160-1164.

Ji, A., Wroblewski, J. M., Cai, L., de Beer, M. C., Webb, N. R. and van der Westhuyzen, D. R. 2012. Nascent HDL formation in hepatocytes and role of ABCA, ABCG1, and SR-BI. *J Lipid Res*. 54: 446-455.

Jongsook, K. K., Zhen, X., Bhaskar, P., Ji, M., Sungsoon, F., Deepthi, K., Stephanie, T., Shwu-Yuan, W., Cheng-Ming C. and Timothy, D. V. 2009. FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell Metab*. 10: 392-404.

Jørgensen, S. B., Treebak, J. T., Viollet, B., Schjerling, P., Vaulont, S., Wojtaszewski, J. F. and Richter, E. A. 2007. Role of AMPK α 2 in basal, training-, and AICAR-induced GLUT4, hexokinase II, and mitochondrial protein expression in mouse muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 292: 331-339.

Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D. and Hardie, D. G. 2005. AMP activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*. 1: 15-25.

Kang, S., and R. A. Davis. 2000. Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion. *Biochim Biophys Acta*. 1529: 223-230.

Kemper, J. K., Xiao, Z., Ponugoti, B., Miao, J., Fang, S., Kanamaluru, D., Tsang, S., Wu, S. Y., Chiang, C. M. and Veenstra, T. D. 2009. FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell Metab*. 10: 392-404.

Kim, Y. D., Park, K. G., Lee, Y. S., Park, Y. Y., Kim, D. K., Nedumaran, B., Jang, W. G., Cho, W. J., Ha, J., Lee, I. K., Lee, C. H. and Choi, H. S. 2008. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes* 57: 306-314.

Kimura, T., Tomura, H., Sato, K., Ito, M., Matsuoka, I., Im, D. S., Kuwabara, A., Mogi, C., Itoh, H., Kurose, H., Murakami, M. and Okajima, F. 2010. Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *J Biol Chem.* 285: 4387-4397.

Kindel, T., Lee, D. M. and Tso, P. 2010. The mechanism of the formation and secretion of chylomicrons. *Atheroscler Suppl.* 11: 11-16.

Kiss, R. S., McManus, D. C., Franklin, V., Tan, W. L., McKenzie, A., Chimini, G. and Marcel, Y. L. 2003. The lipidation by hepatocytes of human apolipoprotein A-I occurs by both ABCA1-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem.* 278: 10119-10127.

Kita, T., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1980. Feedback regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in livers of mice treated with mevinolin, a competitive inhibitor of the reductase. *J Clin Invest.* 66: 1094-1100.

Kocher, O. and Krieger, M. 2009. Role of the adaptor protein PDZK1 in controlling the HDL receptor SR-BI. *Curr Opin. Lipidol.* 20: 236-241.

Kocher, O., Yesilaltay, A., Cirovic, C., Pal, R., Rigotti, A. and Krieger, M. 2003. Targeted disruption of the PDZK1 gene in mice causes tissue-specific depletion of the high density lipoprotein receptor scavenger receptor. *J Biol Chem.* 278: 52820-52825.

Krieger, M. and Herz, J. 1994. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem.* 63: 601-637.

Kurth-Kraczek, E. J., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J. and Winder, W. 1999. 5'AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes* 48: 1667-1671.

Kwiterovich, P. O. Jr. 2000. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *Am J Cardiol.* 86: 250-500.

Kypreos, K. E. and Zannis, V. I. 2006. LDL receptor deficiency or apoE mutations prevent remnant clearance and induce hypertriglyceridemia in mice. *J Lipid Res.* 47: 521-529.

Langer, T., Strober, W. and Levy, R. I. 1972. The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest.* 51: 1528-1536.

Lauzier, B., Delemasure, S., Collin, B., Duvillard, L., Menetrier, F. and Vergely, C. 2011. Effect of a chronic cholesterol-rich diet on vascular structure and oxidative stress in LDLR^{-/-} mice. *Cell Physiol Biochem.* 27: 31-36.

Lazar, J., Soh, J., Albitar, M., Gowda, S., Hussain, M. M. and Wadgaonkar, R. 2013. Dysregulation of ubiquitin-proteasome pathway and apolipoprotein A metabolism in sickle cell disease-related pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ.* 3: 851-855.

Leclerc, I., Lenzner, C., Gourdon, L., Vaulont, S., Kahn, A. and Viollet, B. 2001. Hepatocyte nuclear factor-4 α involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 50: 1515-1521.

Lee, J. O., Lee, S. K., Jung, J. H., Kim, J. H., You, G. Y., Kim, S. J., Park, S. H., Uhm, K. O. and Kim, H. S. 2011. Metformin induces Rab4 through AMPK and modulates GLUT4 translocation in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol.* 226: 974-981.

Leiva, A., Verdejo, H., Benítez, M. L., Martínez, A., Busso, D. and Rigotti, A. 2011. Mechanisms regulating hepatic SR-BI expression and their impact on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 217: 299-307.

Li, D., Wang, D., Wang, Y., Ling, W., Feng, X. and Xia, M. 2010. Adenosine monophosphate-activated protein kinase induces cholesterol efflux from macrophage-derived foam cells and alleviates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Biol Chem.* 285: 33499-33509.

Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M. M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E. and Shyy, J. Y. J. 2011. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* 13: 376-388.

Liadaki, K. N., Liu, T., Xu, S., Ishida, B. Y., Duchateaux, P. N., Krieger, J. P., Kane, J., Krieger, M. and Zannis, V. I. 2000. Binding of high density lipoprotein (HDL) and discoidal reconstituted HDL to the HDL receptor scavenger receptor class B type I: effect of lipid association and APOA-I mutations on receptor binding. *J Biol Chem.* 275: 21262-21271.

Luangrath, V., Brodeur, M. R., Rhainds, D. and Brissette, L. 2008. Mouse CD36 has opposite effects on LDL and oxidized LDL metabolism in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28: 1290-1295.

Lund-Katz, S. and Phillips, M. C. 1984. Packing of cholesterol molecules in human high-density lipoproteins. *Biochemistry* 23:1130-1138.

Maeno, Y., Fujioka, H., Hollingdale, M. R., Ockenhouse, C. F., Nakasawa S. and Aikawa, M. 1994. Ultrastructural localization of CD36 in human hepatic sinusoidal lining cells, hepatocytes, human hepatoma (HepG2-A16) cells, and C32 amelanotic melanoma cells. *Exp Parasitol.* 79: 383-430.

Maric, J., Kiss, R. S., Franklin, V. and Marcel, Y. L. 2005. Intracellular lipidation of newly synthesized apolipoprotein A-I in primary murine hepatocytes. *J Biol Chem.* 280: 39942–39949.

Martinez, L. O., Jacquet, S., Esteve, J. P., Rolland, C., Cabezón, E., Champagne, E., Pineau, T., Georgeaud, V., Walker, J. E., Tercé, F., Collet, X., Perret, B. and Barbaras, R. 2003. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 421: 75-79.

Matthews, M. E. 1957. The theory of tracer experiments with ³H-labelled plasma proteins. *Physiol Med Biol.* 2: 36-53.

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 USA.* 101: 7100-7105.

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 USA.* 102: 2069-2074.

Mayne, J., Dewpura, T., Raymond, A., Bernier, L., Cousins, M., Ooi, T. C., Davignon, J., Seidah, N. G., Mbikay, M. and Chrétien, M. 2011. Novel loss-of-function PCSK9 variant is associated with low plasma LDL cholesterol in a French-Canadian family and with impaired processing and secretion in cell culture. *Clin Chem.* 57: 1415-1423.

McFarlane, A.S. 1948. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* 182: 53-54.

Miller, M., Cannon, C. P., Murphy, S. A., Qin, J., Ray, K. K. and Braunwald, E. 2008. Impact of triglyceride levels beyond low-density lipoprotein cholesterol after acute coronary syndrome in the PROVE IT-TIMI 22 trial. *J Am Coll Cardiol* 51: 724-730.

Miller, N. E. and Miller, G. J. 1975. High-density lipoprotein and atherosclerosis. *Lancet* 1: 1033.

Mogilenko, D. A., Dizhe, E. B., Shavva, V. S., Lapikov, I. A., Orlov, S. V. and Perevozchikov, A. P. 2009. Role of the nuclear receptors HNF4 alpha, PPAR alpha, and LXRs in the TNF alpha-mediated inhibition of human apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells. *Biochemistry* 48: 11950-11960.

Momcilovic, M., Hong, S. P. and Carlson, M. 2006. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem.* 281: 25336-25343.

Murao, K., Yu, X., Imachi H., Cao, W. M., Chen, K., Matsumoto, K., Nishiuchi, T., Wong, N. C. and Ishida, T. 2008. Hyperglycemia suppresses hepatic scavenger receptor class B type I expression. *Am J Physiol.* 294: 78-87.

Nagata, K. O., Nakada, C., Kasai, R. S., Kusumi, A. and Ueda, K. 2013. ABCA1 dimer-monomer interconversion during HDL generation revealed by single-molecule imaging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110: 5034-5039.

Nasser, N. J., Kaplan, M., Nevo, E. and Aviram M. 2009. Lipid profile and serum characteristics of the blind subterranean mole rat, Spalax. *PLoS One* 4: 4528.

Nelson, L. E., Valentine, R. J., Cacicedo, J. M., Gauthier, M. S., Ido, Y. and Ruderman, N. B. 2012. A novel inverse relationship between metformin-triggered AMPK-SIRT1 signaling and p53 protein abundance in high glucose-exposed HepG2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 303: 4-13.

Ni, Y. G., Condra, J. H., Orsatti, L., Shen, X., Di Marco, S., Pandit, S., Bottomley, M. J., Ruggeri, L., Cummings, R. T. and Cubbon, R. M. 2010. A proprotein convertase subtilisin-like/kexin type 9 (PCSK9) C-terminal domain antibody antigen-binding fragment inhibits PCSK9 internalization and restores low density lipoprotein uptake. *J Biol Chem.* 285: 12882-12891.

Oliaro-Bosso, S., Calcio Gaudino, E., Mantegna, S., Giraud, E., Meda, C., Viola, F. and Cravotto, G. 2009. Regulation of HMGCoA reductase activity by policosanol and octacosadienol, a new synthetic analogue of octacosanol. *Lipids* 44: 907-916.

O'Neill, H. M. 2013. AMPK and exercise: glucose uptake and insulin sensitivity. *J Diabetes Metab.* 37: 1-21.

Owen, M.R., Doran, E. and Halestrap, A.P. 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *J Biochem.* 348: 607-614.

Park, H. W., Park, H., Ro, S. H., Jang, I., Semple, I. A., Kim, D. N., Kim, M., Nam, M., Zhang, D., Yin, L. and Lee, J. H. 2014. Hepatoprotective role of Sestrin2 against chronic ER stress. *Nat Commun.* 5: 4233.

Pu, J., Peng, G., Li, L., Na, H., Liu, Y. and Liu, P. 2011. Palmitic acid acutely stimulates glucose uptake via activation of Akt and ERK1/2 in skeletal muscle cells. *J Lipid Res.* 52: 1319-1327.

Quan, H.Y., Kim, do Y. and Chung, S. H. 2013. Caffeine attenuates lipid accumulation via activation of AMP-activated protein kinase signaling pathway in HepG2 cells. *BMB Rep.* 46: 207-212.

Rashid, S., Curtis, D. E., Garuti, R., Anderson, N. N., Bashmakov, Y., Ho, Y. K., Hammer, R. E., Moon, Y. A. and Horton, J. D. 2005. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking PCSK9. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 5374-5379.

Rhinds, D., Brodeur, M., Lapointe, J., Charpentier, D., Falstraalt, L. and Brissette, L. 2003. The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters. *Biochemistry* 42: 7527-7538.

Rigotti, A., Miettinen, H. and Krieger, M. 2003. The role of the high density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev.* 24: 357-387.

Rigotti, A., Trigatti, B. L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J. and Krieger, M. 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 12610-12615.

Roberts, D. C., N. E. Miller, S. G. Price, D. Crook, C. Cortese, A. La Ville, L. Masana, and B. Lewis. 1985. An alternative procedure for incorporating radiolabelled cholesteryl ester into human plasma lipoproteins in vitro. *Biochem J*. 226: 319-322.

Ross, R. 1999. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 340: 26-115.

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. *N Engl J Med*. 20: 1891-1900.

Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J. C., Deleuze, J. F., Brewer, H. B., Duverer, N., Denèfle, P. and Assmann, G. 1999. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet*. 22: 352-355.

Rye, K. A., Hime, N. J., Barter, P. J. 1995. The influence of cholesteryl ester transfer protein on the composition, size, and structure of spherical, reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem*. 270: 189-196.

Salpeter, S. R., Buckley, N. S., Kahn J. A. and Salpeter, E. E. 2008. Meta-analysis: metformin treatment in persons at risk for diabetes mellitus. *Am J Med*. 121: 149-157.

Santamarina-Fojo. 2001. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest*. 108: 303-309.

Shimomura, I., Bashmakov, Y., Shimano, H., Horton, J. D., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. 1997. Cholesterol feeding reduces nuclear forms of sterol regulatory element binding proteins in hamster liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 12354-12359.

Sigurdsson, G., Nicoll, A. and Lewis, B. 1975. Conversion of very low density lipoprotein to low density lipoprotein. *J Clin Invest*. 56: 1481-1490.

Silver, D. L. 2002. A carboxyl-terminal PDZ-interacting domain of scavenger receptor B, type I is essential for cell surface expression in liver. *J Biol Chem*. 277: 34042-34047.

Smith, J. D., Le Goff, W., Settle, M., Brubaker, G., Waelde, C., Horwitz, A. and Oda, M. N. 2004. ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I. *J Lipid Res*. 45: 635-644.

Sorci-Thomas, M., Prack, M. M., Dashti, N., Johnson, F., Rudel, L. L. and Williams D.L. 1989. Differential effects of dietary fat on the tissue-specific expression of the apolipoprotein A-I gene: relationship to plasma concentration of high density lipoproteins. *J Lipid Res*. 30: 1397-1403.

Spencer-Jones, N. J., Ge, D., Snieder, H. P. U., Swaminathan, R., Spector, T.D., Carter, N. D. and O'Dell, S. D. 2006. AMP-kinase alpha2 subunit gene PRKAA2 variants are associated with total cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol and high-density lipoprotein-cholesterol in normal women. *J Med Genet*. 43: 936-942.

Stein, Y., Dabach, Y., Hollander, G., Halperin, G. and Stein, O. 1983. Metabolism of HDL-cholesteryl ester in the rat, studied with a nonhydrolyzable analog, cholesteryl linoleyl ether. *Biochim Biophys Acta*. 752: 98-105.

Steinberg, D. 1997. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem*. 272: 20963-20966.

Streicher, R., Kotzka, J., Müller-Wieland, D., Siemeister, G., Munck, M., Avci, H. and Krone, W. 1996. SREBP-1 mediates activation of the low density lipoprotein receptor promoter by insulin and insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem*. 271: 7128-7133.

Tamura, S. and Shimomura, I. 2005. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 11: 1139-1142.

Thampy, K. 1989. Formation of malonyl coenzyme A in rat heart. Identification and purification of an isozyme of A carboxylase from rat heart. *J Biol Chem*. 264: 17631-17634.

Vaisman, B. L., G. Lambert, M. Amar, C. Joyce, T. Ito, R. D. Shamburek, W. J. Cain, J. Fruchart-Najib, E. D. Neufeld, A. T. Remaley, H. B. Jr. Brewer, and S. Santamarina-Fojo. 2001. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia

and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest.* 108: 303-309.

Vinals, M., Xu, S., Vasile, E. and Krieger, M. 2003. Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HDL) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake. *J Biol Chem.* 278: 5325-5332.

Wang, D. S., Jonker, J. W., Kato, Y., Kusuhara, H., Schinkel, A. H. and Sugiyama, Y. 2002. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther.* 302: 510-515.

Wang, H. M., Mehta, S., Bansode, R., Huang, W. and Mehta K.D. 2008. AICAR positively regulate glycogen synthase activity and LDL receptor expression through Raf-1/MEK/p42/44MAPK/p90RSK/GSK-3 signaling cascade. *Biochem Pharmacol.* 75: 457-467.

Wang, J., Burnett, J. R., Near, S., Young, K., Zinman, B., Hanley, A. J., Connelly, P. W., Harris, S. B. and Hegele, R. A. 2000. Common and rare ABCA1 variants affecting plasma HDL cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 1983-1989.

Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F. and Tall, A. R. 2004. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 9774-9779

Wiesner, P., Tafelmeier, M., Chittka, D., Choi, S. H., Zhang, L., Byun, Y. S., Almazan, F., Yang, X., Iqbal, N. and Chowdhury, P. 2013. MCP-1 binds to oxidized LDL and is carried by lipoprotein(a) in human plasma. *J Lipid Res.* 54: 1877-1883.

Wiklund, O., Dyer, C. A., Tsao, B. P. and Curtiss, L. K. 1985. Stoichiometric binding of apolipoprotein B-specific monoclonal antibodies to low density lipoproteins. *J Biol Chem.* 260: 10956-10960.

Wilkening, S. Stahl, F. and Bader, A. 2003. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos.* 31:1035-1042.

Williams, D. L., de La Llera-Moya, M., Thuahnai, S. T., Lund-Katz, S., Connelly, M. A., Azhar, S., Anantharamaiah, G. M. and Phillips, M. C. 2000. Binding and cross-linking studies show that scavenger receptor BI interacts with multiple sites in apolipoprotein A-I and identify the class A amphipathic alpha-helix as a recognition motif. *J Biol Chem.* 275: 18897-18904.

Windmueller, H. G., Herbert P. N. and Levy, R. I. 1973. Biosynthesis of lymph and plasma lipoprotein apolipoproteins by isolated perfused rat liver and intestine. *J Lipid Res.* 14: 215-223.

Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., Carling, D., Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M. and Carling, D. 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol*. 13: 2004-2008.

Xi, X., Han, J. and Zhang J. Z. 2001. Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 276: 41029-41034.

Xiao, B., Sanders, M. J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F. V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P. A., Eccleston, J. F. and Haire, L. F. 2011. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 472: 230-233.

Yap, F., L. Craddock, and J. Yang. 2011. Mechanism of AMPK suppression of LXR-dependent *Srebp-1c* transcription. *Int J Biol Sci*. 7: 645-650.

Yashiro, T., Nanmoku, M., Shimizu, M., Inoue, J. and Sato, R. 2013. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside stabilizes low density lipoprotein receptor mRNA in hepatocytes via ERK-dependent HuR binding to an AU-rich element. *Atherosclerosis* 226: 95-101.

Yesilaltay, A., Kocher, O., Rigotti, A. and Krieger, M. 2005. Regulation of SR-BI-mediated high-density lipoprotein metabolism by the tissue-specific adaptor protein PDZK1. *Curr Opin Lipidol*. 16: 147-152.

Zenimaru, Y., Takahashi, S., Takahashi, M., Yamada, K., Iwasaki, T., Hattori, H., Imagawa, M., Ueno, M., Suzuki, J., Miyamori, I. 2008. Glucose deprivation accelerates VLDL receptor-mediated TG-rich lipoprotein uptake by AMPK activation in skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 368: 716-722.

Zhang, X., Moor, A.N., Merkler, K.A., Liu, Q. and McLean, M.P. 2007. Regulation of alternative splicing of liver scavenger receptor class B gene by estrogen and the involved regulatory splicing factors. *Endocrinology* 148: 5295-5304.

Zhang, Y. and Wahl, L. M. 2006. Synergistic enhancement of cytokine-induced human monocyte matrix metalloproteinase-1 by C-reactive protein and oxidized LDL through differential regulation of monocyte chemotactic protein-1 and prostaglandin E2. *J Leukoc Biol*. 79: 105-113.

Zhang, Y., Zanotti, I., Reilly, M. P., Glick, J. M., Rothblat, G. H. and Rader, D. J. 2003. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation* 108: 661-663.

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J. and Moller, D.E. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 108: 1167-1174.

Sites internet:

- <http://www.intechopen.com/books/medical-complications-of-type-2-diabetes/targeting-ampk-for-therapeutic-intervention-in-type-2-diabetes>
- http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=lipoprot%C3%A9ines&lang=4
- <http://aimeeblack.com/Lipids/Lipid%20Physiology%201.html>