UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS DE L'ACTIVATION DE L'AMPK SUR LE MÉTABOLISME OSSEUX

MÉMOIRE PRÉSENTÉ COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

JADE DESJARDINS

JUIN 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

D'abord, j'aimerais remercier ma directrice Louise Brissette pour qui j'ai une immense gratitude et beaucoup de respect. Elle a été beaucoup plus qu'une superviseure et je serai toujours reconnaissante pour sa confiance et son grand cœur que j'ai continué de découvrir jusqu'aux derniers instants. Je garde en souvenir tous ces rires, ces discussions souvent drôles et joyeuses et parfois tristes qui nous ont, je crois, beaucoup rapprochées. Je suis maintenant convaincue que je n'aurais voulu d'aucune autre directrice! Merci pour les fat Friday et tout le reste.

Je souhaite également rendre hommage à mon codirecteur Robert Moreau qui nous a quittés beaucoup trop tôt. Cet homme attentionné, généreux et curieux aura été une grande inspiration pour moi. Sa présence manquera, j'en suis certaine, à tous ceux l'ayant connu. J'aurais souhaité que ces travaux de recherches soient à la hauteur du professeur, du scientifique et de l'homme qu'il était pour nous tous.

Ensuite, je dois mentionner que tout cela n'aurait pas été une si belle aventure sans la présence de mon cher ami François Dallaire. Il aura été un de mes meilleurs complices et ces années seront inoubliables grâce à lui. On était le meilleur duo!

Un grand merci à David Rhainds pour ses conseils, commentaires et suggestions à caractère scientifique et (le plus souvent) non scientifique, parce que ce qui se dit au lunch reste au lunch!

Ces remerciements ne seraient pas complets sans souligner l'aide précieuse d'Olha Kevorkova et de Corine Martineau qui ont toujours été d'une grande aide et disponibilité.

J'aimerais finalement remercier tous les membres des Centres de Recherches Biomed et TOXEN qui font de l'UQÀM une grande famille. Merci à l'équipe technique de l'UQÀM et plus particulièrement à Denis Flipo pour son expertise en microscopie.

DÉDICACE

À Franky,

parce que ces résultats sont presqu'autant les tiens que les miens et que sans toi, ça n'aurait jamais été aussi épique. Always remember, la science c'est pas d'la tarte! ν.

TABLE DES MATIÈRES

viii
ix
x
xi
xii
1
1
1
3
6
6
10
11
12
14
14
17
19

1.5.1 Métabolisme du cholestérol	19	
1.5.2 Biosynthèse du cholestérol	19	
1.5.3 Lipoprotéines	22	
1.5.3.1 Lipoprotéines de haute densité	23	
1.5.3.2 Lipoprotéines de faible densité	24	
1.5.3.3 Lipoprotéines et cellules osseuses	25	
1.5.4 Récepteurs de lipoprotéines	27	
1.5.4.1 Récepteur de LDL	28	
1.5.4.2 Scavenger receptor class B type I	30	
1.5.4.3 Cluster of differentiation 36	32	
1.6 Métabolisme osseux et lipides	35	
1.6.1 Distribution et composition lipidique des os	36	
1.6.2 Effets des lipides sur le métabolisme osseux	37	
1.7 État de la question	38	
1.8 Objectif à atteindre et méthodes utilisées		

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES	40
2.1 Culture cellulaire	40
2.2 Immunobuvardage	40
2.3 Dosage de cholestérol endogène	42
2.4 qRT-PCR	42
2.5 Mesure de la prolifération cellulaire	43
2.6 Mesure de la migration cellulaire et évaluation du taux mitotique	44
2.7 Évaluation de la différenciation cellulaire	45
2.8 Inhibition de l'expression de l'AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ avec siRNA	46
2.9 Cultures primaires de MSC	46
2.10 Analyses statistiques	47

CHAPITRE III

RÉSULTATS	47	
Activation de l'AMPK par la metformine et l'AICAR		
Modulation du métabolisme du cholestérol par la metformine et l'AICAR	50	
Effets de la metformine et de l'AICAR sur les SREBPs		
Modulation de l'expression des récepteurs de lipoprotéines par la		
metformine et l'AICAR	53	
Effets de la metformine et de l'AICAR sur la prolifération cellulaire	57	
Effets de la metformine et de l'AICAR sur l'Akt	63	
Effets de la metformine et de l'AICAR sur la migration cellulaire	64	
Modulation de l'expression de gènes ostéoblastiques par la metformine et		
l'AICAR	67	
Effets de la metformine et de l'AICAR sur la différenciation cellulaire	67	
Effets de la metformine et de l'AICAR sur les MSC de souris		
C57Bl/6	70	
CHAPITRE IV		
DISCUSSION	73	
CHAPITRE V		
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	85	
BIBLIOGRAPHIE	89	

LISTE DES FIGURES

Figure

Page

1.1	Structure de l'AMPK	2
1.2	Activation et inhibition de l'AMPK	4
1.3	Effets métaboliques de l'activation de l'AMPK	7
1.4	Voie de signalisation et structure des complexes mTOR	9
1.5	Structure moléculaire de la metformine	12
1.6	Structure moléculaire de l'AICAR	13
1.7	Remodelage osseux	15
1.8	Régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans le métabolisme du	
	cholestérol par la SREBP-2	21
1.9	Classification des lipoprotéines	23
1.10	Régulation post-traductionnelle du rLDL par PCSK9	29
1.11	Régulation de l'expression du SR-BI	31
3.1	Effets de la metformine et de l'AICAR sur la phosphorylation de	48
	l'AMPK	
3.2	Effets du temps de traitement sur la phosphorylation de l'AMPK par la	49
	metformine et l'AICAR	
3.3	Modulation du métabolisme du cholestérol par la metformine	51
3.4	Modulation du métabolisme du cholestérol par l'AICAR	52
3.5	Effets de la metformine et de l'AICAR sur l'expression de SREBP-2	54
3.6	Effets de la metformine et de l'AICAR sur l'expression de SREBP-1	55
3.7	Effets de la metformine et de l'AICAR sur l'expression du récepteur de	56
	LDL	
3.8	Effets de la metformine de l'AICAR sur l'expression de SR-BI	58
3.9	Effets de l'AICAR sur la traduction de SR-BI	59
3.10	Effets de la metformine de l'AICAR sur l'expression de CD36	60
3.11	Effets de la metformine et l'AICAR sur la prolifération cellulaire	62
3.12	Effets de la metformine et l'AICAR sur le complexe mTORC1	63
3.13	Effets de la metformine et de l'AICAR sur Akt	65
3.14	Effets de la metformine et l'AICAR sur la migration cellulaire	66
3.15	Effets de la metformine et de l'AICAR sur l'expression de gènes	68
	ostéoblastiques	
3.16	Effets de la metformine et de l'AICAR sur la différenciation cellulaire	70
3.17	Effets de la metformine et l'AICAR sur les MCS	72

LISTE DES TABLEAUX

Fableau		Page

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A
ACC	Acétyl-CoA carboxylase
ADP	Adénosine diphosphate
AICAR	5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	Protéine kinase activée par l'AMP
Аро	Apolipoprotéine
ATP	Adénosine triphosphate
BMP	Bone morphogenic protein
СаМкк	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase
CD36	Cluster of differentiation 36
CE	Ester de cholestérol
CHOL	Cholestérol
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HMGR	3-hydroxy-3-méthylglutaryl CoA réductase
IDL	Lipoprotéine de densité intermédiaire
KO	Knock-out
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LKB1	Kinase hépatique B1
LPL	Lipoprotéine lipase
mTORC1-2	Mammalian target of rapamycin complex 1-2
OCT1	Organic cation transporter 1
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PRAS40	Proline-rich Akt substrate of 40 kDa
PSCK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
RCT	Transport inverse de cholestérol
RE	Réticulum endoplasmique
rLDL	Récepteur de LDL
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
Ser	Sérine
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
SRE	Sterol regulatory element
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
TG	Triglycéride
TAK1	TGF-β-activating kinase 1
Thr	Thréonine
TSC2	Tuberous sclerosis 2
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS

α	Alpha
β	Bêta
°C	Degré Celsius
κ	Kappa
kDa	Kilodalton
Μ	Molaire
nm	Nanomètre
rpm	Tour par minute
γ	Gamma

RÉSUMÉ

Depuis environ une décennie, les études se multiplient quant aux liens entre le métabolisme du cholestérol et les troubles osseux comme l'ostéoporose. La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) est un senseur énergétique important dans les cellules qui lorsqu'activée favorise les voies cataboliques aux dépends des voies anaboliques. L'activation de l'AMPK a des effets positifs sur les taux de cholestérol en augmentant le cholestérol associé aux HDL plutôt qu'aux LDL. L'AMPK est ainsi impliquée dans de nombreux processus métaboliques et de récentes études l'associent désormais aux métabolismes lipidique et osseux. D'un autre côté, les effets des lipides sur les cellules osseuses sont importants mais les mécanismes par lesquels les lipides et le cholestérol influencent les fonctions des cellules osseuses sont très peu connus. Dans le passé, notre équipe a découvert que les cellules osseuses expriment des récepteurs de lipoprotéines et que l'absence de ces récepteurs dans des modèles murins a des conséquences sur les cellules osseuses. Nous nous intéressons maintenant aux effets de l'activation de l'AMPK sur le métabolisme du cholestérol et lipidique dans les ostéoblastes. Nous avons découvert que l'activation de l'AMPK par la metformine, un médicament contre le diabète de type 2 (T2D), dans les cellules ostéoblastiques murines MC3T3-E1 et dans les cellules souches mésenchymales (MSC) de souris C57Bl/6 wild-type (WT) a peu d'effet sur le métabolisme lipidique mais est favorable à la prolifération, migration et différenciation des cellules. Ces effets s'exercent possiblement via l'augmentation du niveau cellulaire du cluster of differentiation 36 (CD36) et l'accroissement de l'expression des gènes ostéoblastiques runt-related transcription factor 2 (runx2), ostérix (osx) et du collagène de type I, A 1 (collal). D'un autre côté, le 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR), un autre activateur d'AMPK, diminue la concentration cellulaire de cholestérol dans les cellules MC3T3-E1, ce qui corrèle avec une diminution de l'enzyme clé de la synthèse endogène de cholestérol : la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl CoA réductase (HMGR). De plus, l'AICAR augmente l'expression du récepteur de LDL (rLDL) et diminue la prolifération, la migration et la différenciation des cellules MC3T3-E1. Nous avons aussi découvert, pour la première fois, que la metformine et l'AICAR activent les voies de la protéine kinase B (Akt), du mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1), un autre régulateur énergétique important, et augmentent l'expression des sterol regulatory element-binding protein 1 et 2 (SREBP-1 et -2) dans les cellules MC3T3-E1. Ces résultats indiquent que la metformine et l'AICAR ont des effets importants sur le métabolisme du cholestérol, lipidique et énergétique des ostéoblastes, mais l'implication de l'AMPK dans ces phénomènes doit encore être élucidée.

Mots clés : AICAR, Akt, CD36, cholestérol, HMGR, rLDL, lipoprotéines, MC3T3-E1, métabolisme osseux, metformine, MSC, mTOR, SR-BI, SREBP-1, SREBP-2.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 AMPK

1.1.1 Structure de l'AMPK

La protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMPK) est une protéine hétérotrimérique de 62 kDa, constituée de trois sous-unités : alpha (α), beta (β) et gamma (γ) (figure 1.1). Chez les rongeurs et l'humain, cette kinase ubiquitaire compte sept gènes codant pour ses unités, soient deux pour la sous-unité catalytique α (α 1 et α^2), deux pour la sous-unité structurelle β (β^1 et β^2) et trois pour la sous-unité régulatrice γ (γ 1, γ 2 et γ 3) (revu par Hardie, 2008). Il y a ainsi 12 isoformes possibles de cette protéine hautement conservée et celles-ci sont réparties différemment selon les tissus et les types cellulaires (revu par Foretz et al., 2006). Par exemple, la sous-unité al est fortement exprimée dans les ostéoblastes et ostéoclastes ainsi que d'autres cellules de la lignée ostéoblastique, alors que la sous-unité a2 n'est que faiblement exprimée dans les ostéoblastes et n'est pas exprimée dans les ostéoclastes (Kasai et al., 2009; Kim et al., 2008; Quinn et al., 2010; Shah et al., 2010). Les sous-unités β1 et β2 semblent exprimées au même niveau alors que bien que les trois sous-unités γ soient également exprimées dans les tissus osseux, leur niveau d'expression dépend du tissu ou de la lignée cellulaire (Kasai et al., 2009; Kim et al., 2008; Quinn et al., 2010; Shah et al., 2010).



Figure 1.1. Structure de l'AMPK. L'AMPK est constituée d'une sous-unité catalytique α , d'une sous-unité γ régulatrice divisée en 4 sites CBS liant les substrats ainsi que d'une sousunité β structurelle liant les deux précédentes. Tirée de Hardie *et al.*, 2012

La sous-unité α contient le site catalytique de cette sérine/thréonine kinase qui est activée lorsqu'il y a phosphorylation de sa thréonine 172 (Thr172) par diverses kinases en amont (McCarty, 2014). Bien que les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ partagent des similarités quant à leur spécificité du substrat (Woods et al., 1996), l'isoforme al est plus souvent retrouvée dans le cytoplasme alors que la sous-unité α^2 est plus fortement exprimée dans le noyau (Salt *et al.*, 1998). La sous-unité α 1 peut être transloquée au noyau lors d'un stress cellulaire (Kodiha et al., 2007). En plus de différer dans leur répartition tissulaire et dans leur compartimentalisation, les sous-unités α sont également activées de façon différente (Alexander et Walker, 2011). En effet, la sousunité a2 est activée plus fortement par l'adénosine monophosphate (AMP) que la sousunité $\alpha 1$ (Salt *et al.*, 1998). La sous-unité β a plutôt un rôle de soutien en liant les sousunités α et γ grâce à son domaine d'interaction protéine-protéine. Cette sous-unité β possède également un domaine de liaison au glycogène dont le rôle reste à caractériser (revu par Foretz *et al.*, 2006). On sait toutefois que la mutation de la sous-unité β cause des problèmes liés au stockage du glycogène chez l'humain (Polekhina et al., 2003). La sous-unité γ a, pour sa part, une activité régulatrice en liant le substrat. Cette sousunité contient une répétition de quatre motifs cystathionine- β -synthase (CBS) numérotés de 1 à 4 (Bateman, 1997).

1.1.2 Activation de l'AMPK

L'activité de l'AMPK est contrôlée par de subtiles variations des niveaux de nucléotides intracellulaires, particulièrement l'AMP. Chez les mammifères, le ratio énergétique doit demeurer positif et être aussi élevé que 10 adénosines triphosphate (ATP) pour 1 adénosine diphosphate (ADP) (revu par Foretz *et al.*, 2006). Ainsi, lorsqu'il y a une demande en énergie entrainée par le jeûne, le stress, l'exercice ou autres, les ratios ATP/ADP et ATP/AMP diminuent en réponse à l'adénylate kinase (ADK) qui est responsable de la conversion d'ADP en ATP et AMP (2 ADP \rightleftharpoons ATP + AMP) (Hardie et Hawley, 2001).

Ainsi, lorsque le pool d'ATP diminue et que celui d'AMP augmente, l'AMP se lie à l'AMPK sur un des quatre sites de la sous-unité γ (figure 1.2). C'est la liaison de l'AMP au site CBS 1 qui déclenche l'activité de l'AMPK en entraînant un changement conformationnel de la protéine et en facilitant sa phosphorylation par des kinases. D'un autre côté, la liaison de l'AMP ou de l'ADP au site CBS 3 empêche la déphosphorylation de la Thr172 par des phosphatases et prolonge ainsi l'activité de l'enzyme. Contrairement à l'AMP, la liaison de l'ADP n'entraine pas l'activation de l'AMPK. Finalement, le site CBS 2 semble demeurer libre alors que le site CBS 4 lie l'AMP de façon constitutive et n'a pas d'affinité pour l'ADP ou l'ATP (Xiao *et al.*, 2011). Les sous-unités α libres sont généralement inactives suite à un phénomène d'auto-inhibition dû à la conformation de la protéine qui empêche la liaison du substrat

(Cheung *et al.*, 2000). Toutefois, il a été suggéré que de petites molécules peuvent lever cette auto-inhibition, rendant ainsi le complexe constitutivement actif et possiblement résistant à la dégradation (Pang *et al.*, 2008). Le fait que l'AMPK conserve une certaine activité intrinsèque lui permet de réagir rapidement aux stimuli énergétiques (Suter *et al.*, 2006).



Figure 1.2. Activation et inhibition de l'AMPK. Lors d'une diminution de la conversion de l'ADP et de l'AMP en ATP, le pool d'ATP est réduit, l'AMP qui augmente dans la cellule se lie donc sur l'AMPK et engendre un changement de conformation de la protéine permettant sa phosphorylation sur la sous-unité α par différentes kinases telles que LKB1, CaMKK et TAK1. L'AMPK activée déclenche ensuite une cascade d'évènements menant au rétablissement du pool d'ATP en activant des voies cataboliques et en inhibant des voies anaboliques. L'AMPK est ensuite déphosphorylée et inactivée par des phosphatases lorsque le pool d'ATP est rétabli. Tirée de Hurtado *et al.*, 2013.

La kinase hépatique B1 (LKB1) est une des kinases qui se lie sur la Thr172, la phosphoryle et ainsi active l'AMPK. La LKB1 semble être constitutivement active

puisque son activité ne dépend pas du ratio AMP/ATP (revu par Foretz et al., 2006). La calmodulin-dependant kinase (CaMKK) est une deuxième protéine kinase qui peut phosphoryler l'AMPK. Il existe deux isoformes de la protéine CaMκκ, soient CaMκκα et CaMκκβ. L'isoforme β est la principale activant l'AMPK (Hawley *et al.*, 2005). La CaMκκβ phosphoryle l'AMPK en réponse à une hausse intracellulaire de Ca²⁺. Puisque la variation des taux intracellulaires de calcium précède souvent une demande énergétique, il peut être supposé que la CaM $\kappa\kappa\beta$ prépare la cellule pour une demande énergétique en activant l'AMPK (Carling et al., 2008). La hausse du calcium intracellulaire peut également refléter un stress cellulaire. Le mécanisme précis d'activation de l'AMPK par CaMkk reste toutefois peu connu (Foretz et al., 2006; Xiao et al., 2011). Finalement, la protéine TGF-*β*-activating kinase 1 (TAK1) de la famille des mitogen-activated protein kinases (MAPK) phosphoryle l'AMPK en situation d'autophagie (Herrero-Martín et al., 2009). L'autophagie, un processus cellulaire d'auto-dégradation de composants endommagés ou qui ne sont plus utiles, est essentielle au maintien de l'intégrité cellulaire (He et Klionsky, 2009). Lorsqu'activée, l'AMPK inhibe la progression du cycle cellulaire pour prévenir l'apoptose et déclenche les processus autophagiques de survie en réponse à des conditions de stress bioénergétique (Liang et al., 2007).

L'AMPK peut également être activée par des hormones telles la leptine et l'adiponectine, toutes deux dérivées des tissus adipeux, ainsi que par des cytokines comme l'interleukine 6 (IL-6) et le *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) (Zhou *et al.*, 2009). Finalement, des agents pharmacologiques peuvent mener à l'activation de l'AMPK, deux de ceux-ci sont décrits plus loin dans le texte. Tel que démontré à la figure 1.3, une fois activée, l'AMPK stimule les voies cataboliques responsables de la production d'énergie comme la glycolyse et l'oxydation des acides gras et inactive les voies anaboliques consommatrices d'énergie comme la prolifération cellulaire et la synthèse des protéines, d'acides gras et de cholestérol afin de rétablir la balance énergétique (revu par Viollet *et al.*, 2012). L'AMPK est donc considérée comme une enzyme clé du métabolisme énergétique (Hardie, 2008).

1.1.3 Inactivation de l'AMPK

Lorsque la balance énergétique est rétablie et que les ratios ATP/AMP et ATP/ADP sont augmentés, l'ATP peut se lier à l'AMPK et bloquer son site de liaison à l'AMP, empêchant ainsi son activation. Puisque l'ATP a une affinité moindre pour l'AMPK que l'AMP et ADP, il en faut une grande concentration pour favoriser sa liaison à l'AMPK et ainsi désactiver l'enzyme (Hardie et Hawley, 2001). Les protéines phosphatases 2A et 2C (PP2A et PP2C) inactivent l'AMPK en déphosphorylant sa Thr172 (figure 1.2). Ces dernières sont régulées négativement par l'AMP (Davies *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2007). PP2A joue également un rôle dans l'interaction entre les sous-unités α et γ de l'AMPK (Wu *et al.*, 2007; Gimeno-Alcaniz et Sanz, 2003).

1.2 Effets métaboliques de l'AMPK

Tel que mentionné précédemment, l'AMPK favorise les voies cataboliques productrices d'énergie et inactive les voies anaboliques consommatrices d'énergie. L'enzyme régule, entre autres, le métabolisme du cholestérol, des protéines, des glucides et des lipides (figure 1.3).



Figure 1.3. Effets métaboliques de l'activation de l'AMPK. L'AMPK est considérée comme une enzyme clé dans le métabolisme énergétique puisqu'elle agit sur un très grand nombre de voies de signalisation impliquées dans le métabolisme des glucides, des protéines et des lipides ainsi que dans des processus biologiques tels que l'autophagie et la biogénèse mitochondriale. Tirée de Harada *et al*, 2016.

Notamment, l'activation de l'AMPK aboutit à la phosphorylation et à l'inhibition de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMGR), l'enzyme limitante de la synthèse de cholestérol endogène qui réduit l'HMG-CoA en acide mévalonique (Beg *et al.*, 1978). L'AMPK phosphoryle et inactive également l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), principale enzyme impliquée dans la synthèse des acides gras (Carlson et Kim, 1973). Toujours dans le but d'augmenter la production d'ATP, on observe également une diminution de la synthèse de glycogène et une augmentation de la glycolyse suivant l'activation de l'AMPK (Canto et Auwerx, 2010).

L'AMPK inhibe la synthèse protéique, la prolifération et la viabilité cellulaire en interagissant notamment avec la protéine mammalian target of rapamycin (mTOR) (Inoki et al., 2003). mTOR est une protéine kinase de la famille des phosphoinositide 3-kinase related protein kinases (PIKK) qui contrairement à l'AMPK, favorise des voies anaboliques comme la synthèse de protéines et d'autres macromolécules, la prolifération cellulaire et plusieurs autres voies impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire (figure 1.4). En effet, la protéine mTOR répond aux modifications intracellulaires de nutriments, d'oxygène, d'énergie et de signaux mitotiques et favorise la prolifération et croissance cellulaire (Liu et al, 2009). mTOR est la sousunité catalytique de deux complexes distincts nommés mTORC1 (complexe 1) et mTORC2 (complexe 2), différenciés selon leurs protéines régulatricesaccessoires, soient respectivement Raptor et Rictor (figure 1.4). Ces deux protéines assurent l'assemblage des complexes, le recrutement des substrats et ont un rôle régulateur (revu par Zoncu et al., 2011). Raptor est responsable du recrutement de substrats au complexe comme la ribosomal protein S6 kinase 1 (p70S6K), enzyme impliquée dans la synthèse protéique (Nojima et al., 2003). Plus précisément, le complexe mTORC1 phosphoryle et active la protéine ribosomale S6K qui fait partie de la sous-unité 40S du ribosome, facilitant ainsi la traduction protéique (Jefferies et al., 1997). De plus, le complexe mTORC1 phosphoryle et inactive le répresseur transcriptionnel 4E-BP1, permettant la libération du facteur initiateur de transcription 4E (eIF-4E) et ainsi un recrutement de la machinerie traductionnelle à l'extrémité 5' des ARN messagers (ARNm, Gingras et al., 2001). La synthèse protéique est la fonction la mieux caractérisée de ce complexe. Le complexe mTORC1 intervient également dans la synthèse des lipides nécessaires à la formation de la membrane cellulaire de cellules en division en augmentant l'expression des sterol regulatory element-binding protein 1/2 (SREBP-1/2) (revu par Laplante et Sabatini, 2012). Ces protéines sont décrites plus loin dans le texte. Le complexe mTORC1 est activé notamment par la protéine kinase B (Akt ou PKB) qui inactive TSC2, un régulateur négatif du complexe (revu par Inoki et al., 2003). L'Akt phosphoryle également la protéine proline-rich Akt substrate of 40 kilodaltons

(PRAS40) qui empêche la liaison de Raptor sur le complexe, permettant ainsi le recrutement des substrats au complexe mTORC1 (revu par Zoncu *et al.*, 2011).



Figure 1.4. Voie de signalisation et structure des complexes mTORC1 et mTORC2. Le complexe MTORC1 contient la protéine régulatrice Raptor et est sensible à la rapamycine. Une fois activé, le complexe mTORC1 favorise la synthèse protéique, la survie, la prolifération et inhibe l'autophagie. Le complexe mTORC2 inclut la protéine Rictor et est insensible à la rapamycine. Ce deuxième complexe est moins bien connu mais on sait qu'il a un rôle dans l'organisation du cytosquelette et la survie cellulaire. Tirée de Laplante et Sabatini, 2012.

L'activation de l'Akt nécessite sa phosphorylation sur la thréonine 308 (Thr308) par la *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) (Sarbassov *et al.*, 2005) et la phosphorylation de la sérine 473 (Ser473) par une kinase que l'on avait nommée PDK2 jusqu'à la découverte que le complexe mTORC2 pourrait être responsable de cette phosphorylation (Hresko et Mueckler, 2005). La phosphorylation de la Ser473 active

9

l'Akt et la rend sujette à la phosphorylation ultérieure sur la Thr308, augmentant d'autant plus son activité. Cette deuxième phosphorylation sert également de contrôle négatif lors d'une activation prolongée (revu par Zoncu *et al.*, 2011). Le complexe mTORC2 contient la protéine régulatrice Rictor essentielle à sa stabilité et ses fonctions. Ce complexe est insensible à la rapamycine. Les fonctions du complexe mTORC2 sont moins bien élucidées que le complexe 1, mais celui-ci semble intervenir dans la formation du cytosquelette via la protéine kinase C alpha (PKCa) (Sarbassov *et al.*, 2004). Le complexe mTORC2 est également impliqué dans l'autophagie via le facteur de transcription *forkhead box O* (FOXO3) (Mammucari *et al.*, 2007) et dans le métabolisme énergétique via son activité sur l'Akt (revu par Zoncu *et al.*, 2011).

En condition de stress énergétique, l'AMPK phosphoryle et augmente l'activité de la protéine *tuberous sclerosis 2* (TSC2), un régulateur négatif du complexe mTORC1. L'AMPK phosphoryle et inactive également directement la protéine Raptor, une des sous-unités du complexe mTORC1 (Gwinn *et al.*, 2008). L'inhibition du complexe mTORC1 par l'AMPK mènerait donc à l'inhibition de voies anaboliques comme la prolifération, la croissance cellulaire et la synthèse de macromolécules pour plutôt favoriser des voies cataboliques productrices d'énergie et ainsi répondre aux stress cellulaires.

1.3 Activateurs d'AMPK

Pour tous ses effets métaboliques, l'AMPK est considérée comme un senseur énergétique important pour les cellules et est étudiée comme une cible thérapeutique potentielle pour plusieurs maladies métaboliques. De plus en plus de thérapies visent à utiliser ses effets bénéfiques pour le métabolisme suite à son activation.

1.3.1 Metformine

La metformine (1,1-diméthylbiguanide) est le médicament le plus prescrit dans le monde contre le diabète de type 2 (T2D), avec au moins 120 millions d'utilisateurs (Nathan et al., 2009; Viollet et al., 2012). La metformine (figure 1.5), faisant partie de la famille des biguanides, est considérée comme une drogue antihyperglycémiante puisqu'elle abaisse de taux de glucose sanguin sans causer d'hypoglycémie. Elle est également utilisée pour augmenter la sensibilité à l'insuline, généralement réduite en cas de T2D (Gunton et al., 2003). Dans les cellules, la metformine est captée via le transporteur de cations organiques 1 (OCT1) et l'expression prédominante de ce transporteur dans le foie explique pourquoi la metformine agit principalement dans cet organe (Shu et al., 2007). Une fois dans la cellule, la metformine agit sur la mitochondrie où elle inhibe la chaine de transport des électrons au niveau du complexe I. Bien que le mécanisme précis ne soit pas éclairci, on sait que cette inhibition de la chaine de transport des électrons diminue la synthèse d'ATP, débalançant ainsi l'équilibre énergétique et favorisant l'activation de l'AMPK (revu par Viollet et al., 2009). C'est cette inhibition de la production d'ATP qui diminue la néoglucogenèse et abaisse le taux de glucose sanguin en augmentant l'utilisation de celui-ci dans les cellules périphériques des patients T2D. L'efficacité de la metformine à inhiber la chaine de transport des électrons dépend de son accumulation dans la matrice mitochondriale et de l'intensité de l'activité mitochondriale de la cellule (Owen et al, 2000). C'est pourquoi la metformine a un grand succès comme agent anti-hyperglycémiant, car contrairement à un inhibiteur total de la chaine de transport comme la roténone, un pesticide neurotoxique, elle abaisse le taux de glucose sans causer d'hypoglycémie (Rena *et al*, 2013). Les effets de la metformine sur l'AMPK ne sont donc pas directs mais sont une conséquence de l'inhibition de la production d'ATP par la chaine de transport des électrons (revu par Viollet *et al.*, 2009). La metformine pourrait également stimuler les kinases qui agissent sur l'AMPK ou se lier directement à la molécule pour rendre sa conformation favorable à la fixation des kinases ou défavorable à celle des phosphatases (Hardie et Carling, 1997).



Figure 1.5. Structure moléculaire de la metformine. La metformine (1,1-diméthylbiguanide hydrochloride, $C_4H_{11}N_5$) est un médicament antihyperglycémiant prescrit chez les diabétiques de type 2 qui active l'AMPK en diminuant la synthèse d'ATP suite au blocage de la chaine de transport des électrons dans les mitochondries. ©sigmaaldrich.com.

1.3.2 AICAR

Le 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR), bien que non commercialisé à des fins thérapeutiques, est une molécule grandement utilisée pour activer l'AMPK et en étudier les effets autant *in vivo* qu'*in vitro*. L'AICAR (figure 1.6) fut le premier activateur d'AMPK découvert (Corton *et al.*, 1994). Une fois internalisé dans la cellule, l'AICAR est phosphorylé et converti en ZMP (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside monophosphate), un analogue de l'AMP, ce qui augmente le ratio AMP/ATP (revu par Foretz *et al*, 2006). Le ZMP se lie sur la sous-

unité γ de l'AMPK pour l'activer au même titre que l'AMP, mais avec un potentiel 50 fois moins élevé que l'AMP. On sait également que le ZMP interagit avec d'autres enzymes que l'AMPK et pourrait donc avoir des effets indépendants de l'AMPK (Zorn et Wells, 2010). Le ZMP peut, par exemple, se lier directement et inhiber le complexe I de la chaine de transport des électrons dans des mitochondries isolées (Guigas *et al*, 2007). L'AICAR est un activateur de l'AMPK plus puissant que la metformine. Pour avoir une phosphorylation de l'AMPK aussi importante qu'avec 0,5 mM d'AICAR, il aura fallu à Zhou et ses collègues (2001), 2 mM de metformine après 1h ou 0,5 mM après 7h de traitement dans des hépatocytes primaires de rats.



Figure 1.6. Structure moléculaire de l'AICAR. L'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside, C₉H₁₅N₄O₈P) est un analogue synthétique de l'AMP qui active l'AMPK. ©scbt.com.

1. 4 Métabolisme osseux

Le squelette est bien connu pour son rôle de soutien et de protection de l'organisme, les os ont toutefois de nombreuses autres fonctions. En effet, la moelle osseuse est le site de production des cellules hématopoïétiques et le squelette est également le réservoir de minéraux essentiels le plus important du corps. Les os sont une structure minéralisée et poreuse constituée de cellules, de vaisseaux sanguins et d'une espèce minérale nommée l'hydroxyapatite (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂). Le tissu osseux est un système dynamique constamment renouvelé par un processus appelé remodelage osseux. Il existe deux types d'os dans un squelette normal, les os corticaux (compacts) et les os trabéculaires (spongieux). L'os cortical constitue 80% du squelette et est dense et compact, il recouvre la partie externe de tout le tissu osseux de l'organisme. L'os compact subit peu de remodelage et est responsable de la solidité des os. L'os trabéculaire, représentant 20% du squelette, se retrouve au milieu des os et a une structure ressemblant à une éponge, il est plus élastique, moins dense et exerce surtout une fonction métabolique puisque la majorité du remodelage s'y produit (revu par Hadjidakis et Androulakis, 2006). Le remodelage osseux implique deux types cellulaires principaux : les ostéoclastes provenant des cellules souches hématopoïétiques et les ostéoblastes dérivant des cellules souches mésenchymales (MSC) (revu par Pino *et al.*, 2012).

1.4.1 Remodelage osseux

Les os séquestrent la majorité du calcium et du phosphore de l'organisme et sont constamment sollicités pour le relargage de ces minéraux via la résorption osseuse ou pour leur séquestration via la formation osseuse. Le remodelage osseux s'accomplit durant toute la vie et permet l'homéostasie des minéraux ainsi que la réparation des os endommagés ou vieillis. Le remodelage osseux débute lorsque les ostéocytes, au sein de l'os, envoient des signaux initiant le remodelage (figure 1.7). Des facteurs paracrines et des chimiokines sont ainsi expédiés à la surface de l'os et les cellules bordantes de la lignée ostéoblastique exposent une partie de l'os après avoir digéré enzymatiquement certaines protéines de la surface osseuse. Les ostéoclastes et leurs précurseurs hématopoïétiques sont alors recrutés au site de résorption (revu par Sims et Martin, 2014). Les ostéoblastes, suite à ces mêmes signaux, expriment le NF-Kappa B (RANK) ligand (RANKL) qui une fois lié à son récepteur RANK des précurseurs ostéoclastiques, favorise leur prolifération puis leur fusion en cellules matures et plurinucléées. Les ostéoclastes dégradent alors la matrice minéralisée grâce à des pompes à protons qui acidifient le milieu puis des enzymes lysosomales digèrent la matrice organique de l'os. Une fois cette lacune formée, la phase d'inversion commence. Durant celle-ci, les macrophages couvrent la lacune et la préparent pour la formation de nouvelle matrice par les ostéoblastes. À ce stade, l'ostéoprotégérine (OPG), antagoniste de RANK de la famille des récepteurs TNF (facteur de nécrose tumorale), bloque le RANKL et empêchent la division et la maturation des ostéoclastes. Ainsi, les ostéoclastes meurent par apoptose puis les ostéoblastes migrent à la lacune et se divisent pour couvrir celle-ci (revu par Kohli et Kohli, 2011).





Les ostéoblastes sécrètent alors de la nouvelle matrice organique constituée principalement de collagène. Des cristaux d'hydroxyapatite s'intercalent ensuite dans la matrice. Environ 15% des ostéoblastes au site de la lacune restent prisonniers de la matrice et se différencient en ostéocytes. Les ostéocytes sont reliés entre eux par un réseau de microfilaments avec lesquels ils communiquent à travers toute la matrice osseuse. Ces cellules, bien que moins actives que les ostéoblastes, sont responsables du maintien du tissu osseux et envoient des signaux à la surface osseuse lorsqu'une région de l'os nécessite d'être remodelé ou lorsqu'elles meurent par apoptose naturellement ou à la suite d'un dommage physique. Les autres ostéoblastes, étant restés à la surface de la lacune, se différencient en cellules bordantes qui répondront aux stimuli des ostéocytes (revu par Hadjidakis et Androulakis, 2006).

L'équilibre entre la résorption et la formation osseuse est essentiel au maintien du tissu osseux sain. Un déséquilibre favorisant la résorption plutôt que la formation osseuse (trop de résorption ou pas assez de formation) peut mener à l'ostéoporose, une pathologie résultant en une fragilisation des os causée par la perte de masse et de densité osseuses. La moelle osseuse des patients atteints d'ostéoporose montre également une accumulation de cellules adipeuses conjointement à une diminution du nombre d'ostéoblastes (revu par Pino *et al.*, 2012).

Les MSC peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires : les ostéoblastes, les chondrocytes, les adipocytes et les myocytes. Cette différenciation est influencée par des facteurs intrinsèques (génétiques) et par l'environnement (local ou systémique). Ainsi, la combinaison de ces facteurs mène à l'activation de facteurs de transcription propres à chaque lignée. Par exemple, la différenciation des MSC en ostéoblastes est influencée par les facteurs de transcription *runt-related transcription factor 2* (runx2), *distal-less homeobox 5* (DIx5) et ostérix (osx), alors que le facteur de transcription

peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ 2) et d'autres facteurs de transcription de la famille des *CCAAT/enhancer-binding family proteins* (C/EBPs) favorisent leur différenciation en adipocytes. Tous les facteurs influençant la différenciation des cellules souches ne sont pas connus et d'autres facteurs pourraient être impliqués comme les voies Wnt, le facteur de croissance *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), les voies impliquant le *transforming bone factor* (TGF) et les protéines morphogéniques osseuses (BMP) (revu par Pino *et al.*, 2012).

1.4.2 AMPK et le métabolisme osseux

Conséquemment à la prédominance de l'isoforme AMPKa1 dans les tissus osseux (voir la section 1.1.1), les souris AMPKa2 *knock out* (KO) ont une masse osseuse réduite, mais ces effets sont moins importants que chez les souris AMPKa1 KO (Kang *et al.*, 2013). En effet, les souris AMPKa1 KO ont une masse osseuse réduite mais pas de phénotype métabolique particulier (Kang *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2010), alors que les souris AMPKa2 KO ont une sécrétion d'insuline altérée résultant en une légère résistance à l'insuline et des troubles du métabolisme glucidique (Jørgensen *et al.*, 2004; Viollet *et al.*, 2003). Une autre équipe a également observé une masse et densité trabéculaire réduite chez les souris ayant des délétions des sous-unités β 1 ou β 2 sans modification du nombre d'ostéoblastes et d'ostéoclastes. Un profil des marqueurs de formation et de résorption osseuse n'a toutefois pas été investigué dans ce modèle (Quinn *et al.*, 2010). Ceci suppose un rôle direct de l'AMPK sur des phénomènes osseux autres que la différenciation des cellules osseuses.

Il a aussi été montré que l'inhibition de l'AMPK, ou un excès de substrats énergétiques comme le pyruvate, favorise la prolifération et la croissance des ostéoclastes alors que l'activation de l'AMPK par l'AICAR réduit leur prolifération et leur croissance (Fong *et al.*, 2013). Parallèlement à ces résultats, des équipes ont démontré que l'activation de l'AMPK par la metformine ou l'AICAR mène à la prolifération et/ou la différenciation des ostéoblastes, et ce dans des lignées cellulaires et des cultures primaires de souris et de rats (revu par Jeyabalan *et al.*, 2012). Les résultats sont cependant contradictoires puisque certains n'ont observé aucun effet positif de la metformine sur la guérison des fractures chez la souris (Jeyabalan *et al.*, 2013). Il est donc évident que l'AMPK influence les cellules osseuses mais des conclusions claires manquent et les mécanismes précis sont toujours nébuleux.

Dans le même ordre d'idées, le lien entre le métabolisme énergétique et le métabolisme osseux est de plus en plus évident. En effet, il a été découvert que les patients diabétiques ont plus de risque de souffrir de fractures (Khazai *et al.*, 2009) et guérissent plus lentement de ces lésions osseuses (Kayal *et al.*, 2007). Ces conditions étant plus fréquemment observées chez les patients hyperglycémiques suggèrent que ces métabolismes sont étroitement reliés. L'AMPK, étant fortement impliquée dans le métabolisme énergétique, pourrait ainsi avoir des effets indirects sur les cellules osseuses en influençant leur statut énergétique. L'AMPK a donc des rôles au sein du métabolisme osseux mais ses actions directes et indirectes ne sont toujours pas distinguées précisément.

1.5.1 Métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est un composé essentiel à l'intégrité membranaire de toutes les cellules animales en régissant ses propriétés physicochimiques comme sa fluidité et joue un rôle clé dans le transport intracellulaire et la signalisation cellulaire. Il est également un précurseur pour de nombreuses molécules dont les hormones stéroïdiennes, les acides biliaires et certaines vitamines, en plus d'affecter l'internalisation de calcium, la migration et la prolifération cellulaire (revu par Okayasu *et al.*, 2012). Le cholestérol en excès peut toutefois être toxique pour les cellules et sa fine régulation est donc primordiale (Goldstein et Brown, 1990). Le métabolisme du cholestérol est influencé par son absorption intestinale à partir de l'alimentation (environ 25%), de la synthèse *de novo* et de l'excrétion biliaire (Russell, 1992). Bien que la synthèse du cholestérol soit principalement effectuée dans le foie et les intestins, toutes les cellules de l'organisme peuvent synthétiser du cholestérol (Rao, 1995).

1.5.2 Biosynthèse de cholestérol

L'homéostasie lipidique des cellules des vertébrés est principalement régulée par une famille de facteurs de transcription nommés *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs). Ces protéines sont responsables de la régulation de l'expression de plus de 30 gènes impliqués dans la synthèse et la captation de cholestérol mais également des acides gras, triglycérides et phospholipides (Horton et Shimomura, 1999). En situation

normale, les précurseurs des SREBPs sont ancrés dans le réticulum endoplasmique (RE) en complexe avec la protéine *SREBP cleavage-activating protein* (SCAP). Lorsque les taux de cholestérol intracellulaire diminuent, la protéine SCAP, sensible à ces variations, escorte les SREBPs dans des vésicules du RE jusqu'à l'appareil de Golgi (figure 1.8). Les SREBPs acquièrent alors leur forme mature suite à deux clivages par les *site-1 protease* (SP1) et *site-2 protease* (SP2), elles peuvent alors transloquer au noyau et activer divers gènes reliés à la synthèse ou la captation de cholestérol. Lorsque le taux de cholestérol remonte à des taux normaux, le relâchement protéolytique des SREBPs par la protéine SCAP est inhibé et les formes nucléaires sont rapidement dégradées (revu par Horton *et al.*, 2002).

Chez les mammifères, les facteurs de transcription SREBPs regroupent trois isoformes distinctes : SREBP-1a et SREBP-1c dérivés du même gène et SREBP-2 issu d'un second gène (revu par Brown et Goldstein, 1997). Tel que mentionné précédemment, les SREBPs contrôlent plus de 30 gènes reliés au métabolisme lipidique. La protéine SREBP-1a serait un activateur potentiel de tous ces gènes alors que la SREBP-1c est principalement impliquée dans la synthèse des acides gras. La SREBP-2, pour sa part, contrôle principalement des gènes impliqués dans la synthèse et la captation de cholestérol (revu par Horton *et al.*, 2002).



Figure 1.8. Régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol par la SREBP-2. Lors d'une baisse de cholestérol intracellulaire, la protéine SREBP-2 se dissocie du complexe SREBP-2/SCAP, est escortée dans l'appareil de Golgi puis est transloquée au noyau, après clivage par S1P et S2P. SREBP-2 se lie ensuite au SRE et active la transcription de gènes impliqués dans la synthèse ou la captation de cholestérol, comme l'HMGR et le rLDL. ©caymanchem.com.

Tel que mentionné précédemment, l'enzyme limitante de la synthèse de cholestérol est la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl CoA réductase (HMGR) qui contrôle la formation du mévalonate à partir de l'HMG-CoA. La transcription de l'ARNm de l'HMGR est induite par la liaison de SREBP-2 à son élément régulateur de stérols (SRE) dans le noyau. Sa transcription est ensuite inhibée par des métabolites issus du mévalonate qui inhibent le clivage de SREBP-2 et sa translocation au noyau (revu Brown et Goldstein, 1997). L'HMGR est constituée d'une portion cytosolique catalytique et d'une partie membranaire sensible aux changements de concentration des stérols, comme le cholestérol qui rend l'enzyme plus sensible à la dégradation protéolytique (revu par Berg *et al.*, 2002). L'HMGR serait d'ailleurs dégradée par le protéasome après ubiquitination (Hampton *et al.*, 1996). De plus, l'HMGR peut être phosphorylée et inhibée par l'AMPK, la synthèse de cholestérol est donc réduite en réponse à une baisse d'ATP (Clark et Hardie, 1990).

1.5.3 Lipoprotéines

Comme le cholestérol est liposoluble, il ne peut être transporté librement dans le sang, il doit donc être couplé à des transporteurs : les lipoprotéines. Les lipoprotéines sont de grosses molécules amphiphiles composées d'apolipoprotéines (apo) de structure, d'apolipoprotéines périphériques, de lipides structuraux (phospholipides et cholestérol), ainsi que des molécules hautement hydrophobes qu'elles transportent : des triglycérides, des esters de cholestérol ainsi que des vitamines hydrophobes. Les lipoprotéines sont divisées en deux principales classes selon leur apolipoprotéine de structure: celles contenant l'apo-B et celles contenant l'apoAI (revu par Meaney, 2014 et Saland et Ginsberg, 2007). Les apolipoprotéines périphériques définissent les fonctions des lipoprotéines et sont énumérées dans la figure 1.9.



Figure 1.9. Classification des lipoprotéines. Les lipoprotéines sont classées d'après leur apolipoprotéines mais également en fonction de leur taille et de leur densité, c'est-à-dire leur ratio lipides sur protéines. Les HDL sont les lipoprotéines les plus petites et les plus denses alors que les chylomicrons sont les plus grosses et les moins denses. Trig : triglycérides, Chol : cholestérol, PL : phospholipides. Tirée de Saland et Ginsberg, 2007.

1.5.3.1 Lipoprotéines de haute densité

Les lipoprotéines de haute densité (HDL) proviennent principalement du foie d'où elles sont excrétées puis assemblées dans la circulation sanguine à partir de lipides et d'apolipoprotéines libres. Les HDL peuvent également s'assembler à partir d'autres lipoprotéines ou à partir de l'efflux de cholestérol des macrophages ou d'autres cellules périphériques (Jairam *et al.*, 2012). Les principales apolipoprotéines retrouvées dans les HDL sont, en ordre d'importance, l'apoAI, l'apoAII, l'apoAIV et l'apoE. L'apoAI est synthétisée dans le foie et les intestins et 45% des apoAI est couplé à des lipides dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi avant son sécrétion par les hépatocytes. Les apoAI qui ne sont pas couplées à des lipides acquièrent leur cholestérol non estérifié via le transporteur *ATP-binding cassette transporter A1*
(ABCA1) et les lipides des membranes cellulaires ou d'autres lipoprotéines plasmatiques, formant ainsi les HDL précurseures. Ces précurseures discoïdales sont formées d'une bicouche de phospholipides et d'au moins 2 apolipoprotéines. Les HDL discoïdales acquièrent leur forme mature suite à l'action de la lécithine:cholestérol acyltransférase (LCAT) qui estérifie le cholestérol de leur surface, qui migre alors au cœur de la lipoprotéine qui se gorge, la lipoprotéine prend alors une forme arrondie (revu par Rye et Barter, 2014). Les HDL sont responsables du transport inverse du cholestérol (RCT), c'est-à-dire qu'elles transportent le cholestérol dans le sang depuis les tissus périphériques jusqu'au foie où le cholestérol est excrété dans la bile. Pour cette raison, il est dit depuis plusieurs décennies qu'un haut taux de HDL fonctionnelles est associé à une bonne santé cardiovasculaire (Krieger et Kozarsky, 1999). Une autre fonction importante des HDL est le transport du cholestérol jusqu'aux glandes endocrines pour la synthèse des hormones stéroïdiennes (Bochem *et al.*, 2013).

1.5.3.2 Lipoprotéines de faible densité

L'assemblage des lipoprotéines de faible densité (LDL) débute dans le foie où des particules d'apo-B100 sont assemblées avec des triglycérides, du cholestérol et des esters de cholestérol dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) et l'appareil de Golgi pour former les VLDL (lipoprotéines de très faible densité) (Khoo, 2015). Après leur sécrétion par les hépatocytes, les VLDL sont métabolisées en IDL (lipoprotéine de densité intermédiaire) et LDL par la lipoprotéine lipase (LPL) dans les tissus périphériques (revu par Mead *et al.*, 2002). Les LDL sont ensuite internalisées dans les cellules via le récepteur de LDL (rLDL) (Khoo, 2015). Comme les LDL transportent le cholestérol du foie jusqu'aux organes périphériques, une accumulation dans le sang et dans les cellules périphériques est possible. L'accumulation de LDL dans le sang

peut également les rendre susceptibles à l'oxydation (LDLox) et ainsi entrainer des dommages à la paroi vasculaire, ce qui peut mener à l'athérosclérose (revu par Steinberg, 1997). L'athérosclérose est une maladie inflammatoire caractérisée par une accumulation, dans l'intima des artères, de dépôts lipidiques, de cholestérol principalement associé aux LDL, de cellules sanguines, de dépôts calcaires et de minéraux qui bouchent les artères et causent de nombreux problèmes circulatoires (Ross, 1999). C'est pourquoi les LDL sont considérées comme pro-athérogéniques lorsqu'en forte concentration dans le sang et lorsqu'elles sont fortement oxydées (revu par Steinberg, 1997).

1.5.3.3 Lipoprotéines et cellules osseuses

Il a été montré que les ostéoblastes internalisent des lipoprotéines dont les HDL, LDL (Brodeur *et al.*, 2008a) et les chylomicrons (Niemeier *et al.*, 2008) et qu'ils sont capables autant de captation globale que de captation sélective à partir de ces lipoprotéines. Les chylomicrons sont responsables de l'absorption du cholestérol alimentaire dans l'intestin et de son transport jusqu'aux organes périphériques, ces lipoprotéines contiennent principalement l'apo-B48 (Jairam *et al.*, 2012). Les lipoprotéines transportent aussi des vitamines essentielles au métabolisme osseux telles que la vitamine E, la vitamine D et la vitamine K. La vitamine E est un antioxydant transporté par les chylomicrons, les VLDL, les LDL et les HDL (revu par Kayden et Traber, 1993). La vitamine E influence le métabolisme osseux mais les résultats s'avèrent contradictoires quant à ses effets bénéfiques (Feresin *et al.*, 2013) ou néfastes (Fujita *et al.*, 2012) sur le métabolisme osseux. La vitamine K est essentielle à la formation de l'ostéocalcine, une hormone sécrétée par les ostéoblastes qui aide à l'incorporation du calcium dans le tissu osseux et un manque de vitamine K serait

associé à l'ostéoporose (revu par DiNicolantonio *et al.*, 2015). La vitamine K est transportée par les lipoprotéines riches en triglycérides comme les chylomicrons mais également par les LDL et les HDL (Newman *et al.*, 2002; Niemeier *et al.*, 2005). La vitamine D, synthétisée à partir de cholestérol, est importante pour la minéralisation osseuse, directement via son action sur les ostéoblastes qui expriment le récepteur de la vitamine D (VDR) ou indirectement via la régulation de l'homéostasie calcique par l'intestin et les reins. Les effets de la vitamine D sont également parfois positifs mais parfois négatifs selon les études et dépendent grandement des designs expérimentaux des études (revu par Van Driel et Van Leeuwen, 2014). Cette vitamine aurait également un lien avec l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires de façon directe par son interaction avec toutes les cellules impliquées dans l'athérosclérose dont les cellules vasculaires et de façon indirecte par ses effets systémiques sur l'inflammation et sur l'homéostasie minérale (Kassi *et al.*, 2013). La vitamine D est transportée dans le sang par les VLDL (Speeckaert *et al.*, 2010).

Les HDL, LDL et VLDL transportent également de l'œstrogène (Helisten *et al.*, 2001). Il est reconnu que les œstrogènes sont essentiels à la croissance et au maintien du squelette tant *in vivo* qu'*in vitro*. Brièvement, l'œstrogène a des effets sur la prolifération et la différenciation des ostéoblastes et a un effet inhibiteur sur les ostéoclastes en favorisant leur apoptose via, entre autres, TGF β et en inhibant leur activité de résorption (Krassas et Papadopoulou, 2001). Il a été démontré que l'estradiol peut être livré aux ostéoblastes via les LDL et HDL₃ par captation sélective (Brodeur *et al.*, 2008a). L'œstrogène inhibe également la résorption osseuse en modulant de façon complexe de multiples voies de signalisation ayant des conséquences sur le métabolisme osseux (Riggs, 2000).

Considérant que l'athérosclérose et l'ostéoporose ont vraisemblablement des causes communes (Anagnostis *et al.*, 2009; Hamerman, 2005) et que l'augmentation du niveau de LDL dans le sang favorise leur oxydation et augmente les risques d'athérosclérose (revu par Steinberg, 1997), des questionnements ont émergé quant au rôle des LDLox sur les cellules osseuses. Il est ressorti de plusieurs études que les LDLox inhibent la différenciation de cellules ostéoblastiques (Klein *et al.*, 2003; Mody *et al.*, 2001; Parhami *et al.*, 1997, 1999). Les LDLox en grande concentration sont toxiques pour les ostéoblastes puisqu'une fois internalisées, elles sont faiblement dégradées et induisent des dommages aux lysosomes (Brodeur *et al.*, 2008b). Les ostéoblastes auraient également la possibilité d'oxyder les LDL (Brodeur *et al.*, 2008b). Au contraire, l'ajout de HDL₃ dans le milieu de culture réduit l'effet toxique des LDLox sur les ostéoblastes, soutenant ainsi l'hypothèse du rôle protecteur des HDL pour la masse osseuse (Brodeur *et al.*, 2008c).

1.5.4 Récepteurs de lipoprotéines

La quantité de lipoprotéines circulantes dans le sang dépend de leur synthèse mais également de leur captation par leurs récepteurs respectifs dans le foie et les cellules périphériques (revu par Meaney, 2014). Il a été également démontré depuis de nombreuses années que les lipoprotéines en circulation sont sensibles à l'oxydation. Ces lipoprotéines modifiées sont alors plutôt reconnues par des récepteurs de type *scavenger* (revu par Steinberg, 1997).

1.5.4.1 Récepteur de LDL

Le récepteur de LDL (rLDL) est un des déterminants les plus importants dans le métabolisme du cholestérol des hépatocytes. La forme mature du rLDL humain est une glycoprotéine transmembranaire constituée de 839 acides aminés quià a un poids moléculaire de 160 kDa sous forme mature (Yamamoto et al., 1984) et possède 5 domaines fonctionnels (Defesche, 2004). Ce récepteur a une structure hautement conservée chez l'humain et d'autres espèces animales (Südhof et al., 1985). Le rLDL est synthétisé dans le RE, mature dans l'appareil de Golgi, puis est exporté, sous sa forme mature, à la membrane cellulaire (Tolleshaug et al., 1982) où il s'insère dans des puits tapissés de clathrine (Davis et al., 1987). Lorsque le récepteur se couple à un ligand, le complexe récepteur-lipoprotéine est internalisé par endocytose, le récepteur se délie de son ligand et est recyclé à la membrane alors que la lipoprotéine est dégradée. Le rLDL lie les lipoprotéines constituées d'apoB et/ou d'apoE, particulièrement les LDL, mais également les VLDL, IDL et chylomicrons (revu par Soutar, 1996). Le rLDL a normalement une vie de 30 heures durant lesquelles il effectue 150 cycles d'internalisation et de recyclage à la membrane avant d'être dégradé (Brown et al., 1983).

Comme pour l'HMGR, le rLDL est régulé au niveau transcriptionnel par la protéine SREBP-2 (figure 1.8). Une fois au noyau, la SREBP-2 se lie au SRE et active la transcription du rLDL, augmentant ainsi la captation des lipoprotéines (Nohturfft *et al.*, 2000). La régulation post-transcriptionnelle du rLDL (figure 1.10) s'effectue principalement via la protéine *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9* (PCSK9) (Lambert *et al.*, 2009). La protéine PCSK9 se lie au rLDL à la surface extracellulaire et empêche son recyclage en augmentant sa dégradation par les lysosomes (Lagace *et al.*, 2006). Ce processus d'internalisation peut être dépendant de la protéine *autosomal*

recessive hypercholesterolemia (ARH) (Qian *et al.*, 2007), bien qu'il ait été démontré que la surexpression de PCSK9 produit les mêmes effets chez des souris ARH KO (*Park et al.*, 2004).



Figure 1.10. Régulation post-traductionnelle du rLDL par la PCSK9. Une fois sécrétée, la protéine PCSK9 se lie sur le rLDL et entraine sa dégradation lysosomale plutôt que son recyclage à la membrane qui se produit suite à la liaison d'une lipoprotéine. PCSK9 réduit ainsi la quantité de rLDL à la surface cellulaire. Tirée de Brautbar et Ballantyne, 2011.

La présence du rLDL a été démontrée dans plusieurs types de cellules ostéoblastiques dont les MC3T3-E1, une lignée pré-ostéoblastique murine (Haÿ *et al.*, 2009). En plus du transport de cholestérol par les lipoprotéines, des membres de la famille des rLDL, notamment le *low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1), seraient impliqués dans le transport de la vitamine K aux ostéoblastes humains (Niemeier *et al.*, 2005). D'un autre côté, la présence du rLDL serait favorable aux ostéoclastes qui, contrairement aux ostéoblastes, n'expriment que faiblement l'HMGR. Les ostéoclastes

seraient donc plus dépendants de la captation de cholestérol exogène que les ostéoblastes (Luegmayr *et al.*, 2004). Les souris rLDL KO ont ainsi une augmentation de la masse osseuse due aux défauts métaboliques des ostéoclastes ce qui favorise la formation osseuse au détriment de la résorption (Okayasu *et al.*, 2012).

1.5.4.2 Scavenger receptor class B type I

Le scavenger receptor class B type I (SR-BI) est une glycoprotéine de 509 acides aminés et d'environ 80 kDa possédant deux domaines transmembranaires hydrophobes, séparant la boucle extracellulaire hautement glycosylée des extrémités C- et N-terminales intracellulaires (Rigotti et al., 2003). Ce récepteur est présent principalement dans le foie et les cellules stéroïdogènes des glandes surrénales et des gonades (Shen et al., 2014). Le SR-BI lie surtout l'apoAI/II et les HDL, mais il a été démontré qu'il peut également lier les LDL oxydées (LDLox), les LDL non modifiées et les VLDL (revu par Valacchi et al., 2011). Le SR-BI capte les composantes hydrophobes des lipoprotéines par captation sélective du cœur de la lipoprotéine plutôt que par l'endocytose de la lipoprotéine complète. Ce phénomène a été observé avec les LDL (Rhainds et Brissette, 2004) et les HDL (Acton et al., 1996). En effet, la captation sélective du cholestérol des HDL par le SR-BI n'implique pas l'endocytose et la dégradation lysosomale de la lipoprotéine. La captation globale des lipoprotéines par ce récepteur peut toutefois avoir lieu dans certains types cellulaires et dans certaines conditions (revu par Leiva et al., 2011). Le SR-BI humain semble plus dépendant de la captation globale que le SR-BI murin (Zhang et al., 2007). Ce récepteur étant grandement impliqué dans le RCT des HDL, il est également considéré comme antiathérogénique. En effet, les souris SR-BI KO ont des niveaux plasmatiques de cholestérol doublés et développent de l'athérosclérose (revu par Leiva et al., 2011).

Le SR-BI est hautement régulé de façon transcriptionnelle et de façon posttranscriptionnelle. Tel qu'observé dans la figure 1.11, dans les hépatocytes, la transcription du SR-BI peut être augmentée par les facteurs de transcriptions *farnesoid X receptor* (FXR), *liver X receptor alpha* (LXR), PPAR α et PPAR γ alors qu'elle peut être diminuée par le *pregnane X receptor* (PXR) en réponse à différents stimuli. Du côté post-transcriptionnel, la protéine la mieux connue pour la régulation du SR-BI est la *PDZ domain containing 1* (PDZK1), aussi nommée *Na+/H+exchanger regulator factor-3* (NHERF3), qui stabilise la forme protéique du récepteur (revu par Leiva *et al.*, 2011 et Shen *et al.*, 2014). De nombreuses hormones et autres protéines sont également connues pour moduler le SR-BI telles que la leptine, l'insuline ainsi que les vitamines A et E (revu par Leiva *et al.*, 2011).





En 2008, notre laboratoire a confirmé pour la première fois la présence du SR-BI à la surface de plusieurs types cellulaires ostéoblastiques soient les cellules MC3T3-E1, MG-63 (lignée cellulaire d'ostéosarcome humain), hOB (ostéoblastes primaires

humains) et les cellules mOB (ostéoblastes primaires murins). De plus, la fonctionnalité du récepteur a été démontrée via la captation de ligands connus de celuici comme les LDLox, les HDL₃ et l'estradiol (Brodeur *et al.*, 2008a). Quelques années plus tard, d'autres membres du laboratoire se sont penchés sur le rôle du SR-BI dans les cellules osseuses grâce à un modèle de souris SR-BI KO. Ils ont observés que les souris SR-BI KO ont une augmentation du cholestérol associé aux HDL plasmatiques ainsi qu'une masse osseuse augmentée accompagnée d'une hausse du nombre d'ostéoblastes (Martineau *et al.*, 2014a), bien que ces ostéoblastes aient une différenciation altérée (Martineau *et al.*, 2014b). Le nombre d'ostéoclastes est inchangé chez ces mêmes souris (Martineau *et al.*, 2014a). Toutefois, les HDL₃ n'augmentent pas la prolifération des MCS et diminuent l'expression de marqueurs ostéogéniques. De plus, la liaison et la captation des HDL₃ et des œstrogènes ne sont pas altérées de façon significative entre les souris KO et WT. Les effets principaux du SR-BI dans le métabolisme osseux ne seraient donc pas dépendants de la captation de cholestérol ou d'œstrogènes (Martineau *et al.*, 2014b).

1.5.4.3 Cluster of differentiation 36

Le cluster of differentiation 36 (CD36), aussi nommé fatty acid translocase (FAT), est une glycoprotéine d'environ 88 kDa de la famille des scavenger receptors class B au même titre que le SR-BI. Le CD36 possède un domaine extracellulaire et deux domaines transmembranaires flanqués par de courtes séquences cytoplasmiques comprenant les extrémités C- et N-terminales (Oquendo *et al.*, 1989). Le CD36 était d'abord connu pour lier la thrombospondine et le collagène dans les thrombocytes mais fut ensuite associé, dans le milieu des années 90, au métabolisme lipidique après la découverte qu'il lie également les LDLox et les acides gras (revu par Goldberg *et al.*,

2009). Les acides gras ont un rôle primordial dans les cellules, notamment dans la production et le stockage d'énergie, la synthèse de phospholipides et la régulation de l'expression de plusieurs gènes. La plupart des cellules, excluant les adipocytes et les myocytes, ont une faible capacité de stockage des acides gras sous forme de triglycérides, leur approvisionnement dépend donc grandement de la captation d'acides gras du milieu extracellulaire. Les acides gras sont internalisés via plusieurs voies incluant la captation via les LDL, les LDLox et l'hydrolyse de triglycérides à partir de lipoprotéines riches en triglycérides (revu par Xu et al., 2013). Le CD36 est impliqué dans toutes ces voies (Calvo et al., 1998; Collins et al., 2009). Le CD36 lie également les HDL et VLDL (Calvo et al., 1998). Il fut aussi étudié pour son implication dans l'internalisation des érythrocytes infectés à la malaria (*Plasmodium falciparum*) (revu par Cao et al., 1997). On sait maintenant que ce récepteur est fortement exprimé dans les mégacaryocytes et les thrombocytes, dans les monocytes et les macrophages et dans les adipocytes, mais il est également présent dans de nombreux autres types cellulaires (Greenwalt et al., 1995). Il a également été démontré grâce à des modèles de souris CD36 KO, SR-BI KO ou double KO, que le SR-BI a un rôle plus important dans la captation sélective des esters de cholestérol des lipoprotéines que le CD36, mais qu'en absence du SR-BI, le CD36 voit son activité augmenter (Luangrath et al., 2008).

Le CD36 est régulé principalement via sa compartimentalisation dans la cellule. Il est présent dans les vésicules intracellulaires comme les endosomes, le RE et les lysosomes, mais également sur les mitochondries (revu par Goldberg *et al.*, 2009). Dans les muscles, le facteur de transcription *Forkhead box protein O1* (FoxO1) recrute le CD36 à la surface cellulaire pour augmenter l'internalisation d'acides gras en réponse à un faible taux d'insuline, à l'activation de l'AMPK ou encore la contraction musculaire (Bastie *et al.*, 2005). La régulation du CD36 est peu connue mais on suggère qu'elle pourrait également se faire via l'ubiquitination, modifiant ses interactions protéiques, sa distribution intracellulaire et son renouvellement. L'ubiquitination de

son domaine C-terminal, corrélée positivement avec son activité de captation, est inhibée par l'insuline et augmentée par les acides gras (revu par Goldberg *et al.*, 2009). Finalement, lors de l'internalisation de LDLox, les acides gras oxydés issus de leur dégradation provoquent l'activation de PPARγ, ce qui mène à une augmentation de l'expression du CD36. La liaison d'une HDL au SR-BI peut, au contraire, diminuer la synthèse du CD36 via l'inhibition de PPARγ par une voie dépendante des MAPK (Nicholson, 2004).

Tout comme pour le SR-BI, notre laboratoire a démontré la présence et la fonctionnalité de CD36 dans les cellules osseuses MC3T3-E1, MG-63, hOB et mOB (Brodeur *et al.*, 2008a). Toutefois, contrairement au modèle SR-BI KO, le modèle CD36 KO a un phénotype ostéopénique corrélant avec une altération des fonctions des ostéoblastes menant à une formation osseuse diminuée *(*Kevorkova *et al.*, 2013). De plus, le traitement des cellules MC3T3-E1 avec des ligands de CD36 (trombospondine (400-500-600 ng/ml) et hexaréline (10-7 à 10-9 M)) augmente leur prolifération d'environ 50% par rapport aux cellules non traitées (Kevorkova *et al.*, soumis). Ces résultats suggèrent que CD36 pourrait avoir des effets sur les cellules via la captation de lipoprotéines et leur contenu mais également via la captation d'acides gras et l'activation subséquente de voies de signalisation associées à la prolifération cellulaire

1.6 Métabolisme osseux et lipides

Les tissus cardiovasculaires et osseux partagent des ressemblances tant au niveau moléculaire que cellulaire. De façon étonnante, les lésions athérosclérotiques contiennent des BMP, du collagène de type I, de l'ostéocalcine, de l'oxyde nitrique et d'autres composants caractéristiques du tissu osseux. L'athérosclérose et l'ostéoporose

impliquent toutes les deux le recrutement et la différenciation de monocytes qui se différencient en cellules spumeuses dans les artères et en ostéoclastes dans les os. De plus, il est connu que lors de stress chronique, comme par exemple une inflammation persistante, les tissus mous répondent par la minéralisation (ostéophytes, fibrose) alors que les os répondent plutôt par une déminéralisation (ostéoporose, parodontite). Des lipides oxydés créant une inflammation chronique dans les artères ou dans les os pourraient ainsi induire respectivement l'athérosclérose et l'ostéoporose (revu par Parhami *et al.*, 2000). Ceci montre donc l'importance des réponses connexes entre les systèmes cardiovasculaire et osseux et expliquerait en partie la corrélation positive entre les désordres des deux systèmes. Finalement, il a été montré que la thérapie de remplacement d'hormones utilisée pour contrer l'ostéoporose diminue les niveaux circulants de lipides et que des médicaments hypolipidémiants autres que les statines préviennent l'ostéoporose induite par les stéroïdes (revu par Parhami *et al.*, 2000). Le lien entre les os et les lipides est donc de plus en plus étudié afin de comprendre leur interaction et les désordres métaboliques associés.

1.6.1 Distribution et composition lipidique des os

L'équipe de During et ses collègues ont effectué en 2015 un travail impressionnant en synthétisant une grande quantité d'information concernant la distribution et la composition lipidique des os. Ceux-ci soutiennent que la distribution et la quantité de lipides dans les os varient grandement selon différents facteurs. Par exemple, la composition en lipides de la moelle osseuse varie entre 7% dans le fémur du rat et atteint 91% dans le tibia de l'homme. De plus, le vieillissement s'accompagne chez l'homme de la conversion de la moelle osseuse rouge hématopoïétique, en moelle osseuse jaune principalement constituée d'adipocytes. La composition en lipides

transite donc de 28 à 84% entre les individus de 12 et 78 ans. Finalement, des études chez le rat ont montré qu'une diète hypercalorique, enrichie en lipides, protéines ou carbohydrates, augmente la population adipocytaire au sein de la moelle osseuse. La nature de ces lipides a également été étudiée, principalement dans le fémur de plusieurs espèces et les lipides mesurés sont en majorité des triglycérides (54 à 98% des lipides totaux) bien que des phospholipides, du cholestérol libre, des esters de cholestérol et des acides gras aient aussi été mesurés (moins de 3% des lipides totaux). Toutefois, chez le rat, le cholestérol peut constituer entre 11 et 13% des lipides de la moelle osseuse dans le fémur. En plus de la moelle osseuse, les lipides dans les os sont présents dans la partie minéralisée de l'os et ce, à l'intérieur des cellules mais également à l'extérieur de celles-ci dans des régions minéralisées acellulaires. Les lipides sont donc retrouvés dans les cellules osseuses, associés via des liaisons faibles ainsi que dans des régions minéralisées acellulaires où ils sont fortement associés en complexes lipidiques couplés à des protéines et minéraux (revu par During *et al.*, 2015).

1.6.2 Effets des lipides sur le métabolisme osseux

Le cholestérol est, tel que mentionné précédemment, un constituant essentiel à l'intégrité des membranes cellulaires ainsi qu'un précurseur de nombreux constituants clés dans le métabolisme normal des cellules. Les cellules osseuses ont ainsi besoin de cholestérol pour ces raisons. Toutefois, depuis plusieurs années, une corrélation inverse a été établie entre la masse osseuse et le contenu en gras dans la moelle osseuse (revu par During *et al.*, 2015). En effet, cette observation a soulevé un intérêt quant aux

fonctions du cholestérol et des lipides dans les cellules osseuses et les études sur le sujet se multiplient.

Des études sur le sujet ont ainsi soulevé la possibilité d'une relation très étroite entre les adipocytes et les cellules osseuses. La balance entre ces deux types cellulaires est d'autant plus intéressante que des études ont montré que les ostéoblastes et les adipocytes partagent non seulement les mêmes précurseurs mais sont également capables de transdifférenciation réciproque in vitro et ce, même une fois complétement différenciés. Il y a donc une forte plasticité entre les deux types cellulaires (revu par During *et al.*, 2015). D'un autre côté, le cholestérol a des effets directs sur les cellules osseuses. Notamment, les taux circulants de LDL et HDL auraient des effets sur la masse osseuse, malgré qu'il y ait encore des résultats contradictoires sur le sujet (revu par Parhami et al., 2000). L'inhibition de la synthèse endogène de cholestérol via l'HMGR par les statines produit également des effets sur le métabolisme osseux, mais les résultats sont assez différents, parfois positifs (Maeda et al., 2004) et parfois négatifs (Parhami et al., 2002), selon les statines utilisées et le modèle : in vivo ou in *vitro* et selon le modèle cellulaire (revu par During *et al.*, 2015). La différence entre les études in vivo et in vitro pourrait s'expliquer par le fait que dans un modèle in vivo, les statines agissent principalement au niveau du foie (Hamelin et Turgeon, 1998), les statines se retrouveraient alors très peu dans les tissus périphériques et affecteraient les os en diminuant la concentration de cholestérol circulant à des taux plus près de la normale, ce qui aurait des effets positifs sur le métabolisme osseux. Ceci est supporté par le fait que l'hypercholestérolémie est liée à des désordres du métabolisme osseux tant dans des études épidémiologiques (Majima et al., 2008; Orozco, 2004) que fondamentales sur les modèles animaux (Parhami et al., 1999; Pelton et al., 2012; You et al., 2011). Le cholestérol en excès dans le milieu de culture de cellules ostéoblastiques est d'ailleurs néfaste à leur prolifération et leur survie (You et al., 2011). On peut également imaginer que les différents effets des statines, parfois, parfois

négatifs seraient davantage liés à leurs propriétés physicochimiques, à la dose utilisée et aux concentrations de cholestérol circulant.

1.7. État de la question

Comme l'AMPK est un senseur énergétique important dans les cellules, de nombreuses équipes, dont notre laboratoire, se penchent sur ses effets sur le métabolisme lipidique. Les résultats obtenus jusqu'à présent indiquent d'ailleurs que l'activation de l'AMPK a des effets bénéfiques sur le profil lipidique, notamment sur les taux de cholestérol HDL et LDL (revu par Jha, 2014 et Srivastava et al., 2012). L'activation de l'AMPK pourrait ainsi avoir un effet protecteur contre les maladies cardiovasculaires qui touchent une grande partie de la population vieillissante et est visée comme future cible thérapeutique. La littérature est également de plus en plus convaincante quant au lien entre les maladies cardiovasculaires et l'ostéoporose, touchant toutes les deux la même population vieillissante. En effet, des études épidémiologiques associent les deux pathologies et des études fondamentales ont prouvé que le cholestérol en excès a des effets néfastes sur les cellules osseuses (revoir la section 1.6). D'un autre côté, les mécanismes par lesquels les lipides et le cholestérol influencent les fonctions des cellules osseuses sont très peu connus. Les travaux de notre laboratoire ont joué un rôle capital dans la découverte et la caractérisation du rôle des récepteurs de lipoprotéines dans les cellules osseuses tant in vitro (Brodeur et al., 2008a, b, c), qu'in vivo (Kevorkova et al., 2013, Kevorkova et al., soumis; Martineau et al., 2014a, b). L'AMPK a également des effets directs sur les fonctions des cellules osseuses (revoir la section 1.4.2), mais les effets sont multiples et on ignore si ces phénomènes ont un lien avec le cholestérol ou les lipides de façon générale. Il convient donc d'élucider ces phénomènes pour mieux comprendre le rôle de l'AMPK et du cholestérol dans les cellules osseuses. Ces recherches sont d'autant plus attrayantes considérant que des médicaments déjà existants et prescrits, comme la metformine, pourraient avoir des effets positifs en modulant l'AMPK mais également par son action hypolipidémiante et hypocholestérolémiante tant chez des patients avec des problèmes métaboliques que chez des patients ostéoporotiques.

1.8. Objectif à atteindre et méthodes utilisées

L'objectif principal de ce projet est de documenter les effets de l'activation de l'AMPK sur le métabolisme lipidique et diverses fonctions des cellules osseuses. Nous avons émis l'hypothèse que certains effets de l'activation de l'AMPK sur les cellules osseuses pourraient être des conséquences de la modulation du métabolisme du cholestérol. Afin de tester cette hypothèse, l'AMPK est d'abord activée dans les cellules MC3T3-E1 avec un traitement à la metformine ou à l'AICAR. Le métabolisme du cholestérol est ensuite évalué par le niveau cellulaire de cholestérol et de son enzyme clé de biosynthèse (HMGR) et via l'expression des récepteurs de lipoprotéines et d'autres gènes importants pour le métabolisme lipidique. D'autres fonctions essentielles de ces cellules sont également évaluées comme la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire. D'après la littérature disponible, ce projet est le premier à étudier l'effet de la metformine et de l'AICAR sur le métabolisme du cholestérol dans des cellules ostéoblastiques.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire

Pour la première partie du projet, les expériences *in vitro* ont été pratiquées dans les cellules MC3T3-E1, une lignée cellulaire pré-ostéoblastique issue de calvarium de souris. Les cellules ont été mises en culture dans du milieu α -minimum essential medium (MEM) (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal (FBS, Hyclone) et 1% de pénicilline et streptomycine (Gibco) à 37°C en présence de 5% de CO₂. Le milieu fut changé deux fois par semaine. La metformine et l'AICAR ont été employés comme activateurs d'AMPK dans les cellules et ont été dilués dans le milieu de culture selon les concentrations et temps d'exposition choisis et détaillés plus loin dans le texte.

2.2 Immunobuvardage

La quantification de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol et le métabolisme osseux a été réalisée par immunobuvardages. Pour ce faire, les cellules ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits jusqu'à une confluence de 80% en conditions normales puis traitées avec les produits et concentrations indiqués pour les temps mentionnés. L'insuline (Wisent) et la

rapamycine (Millipore) ont été ajoutées 1h avant le traitement à la metformine (Sigma Aldrich) ou à l'AICAR (Toronto Chemicals). La cycloheximide (Sigma-Aldrich) a été ajoutée 30 minutes avant le traitement à la metformine ou à l'AICAR. Pour la récolte des protéines, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont ensuite été rincées deux fois avec du PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄) puis lysées avec un tampon RIPA (150 mM NaCl, 1% triton X-100, 0,5% deoxycholate, 0,1% dodécylsulfate de sodium (SDS) et 50 mM tris, pH 8,0). Les protéines ont été quantifiées par une méthode basée sur l'activité de l'acide bicinchoninique (BCA, Pierce) selon les recommandations du fournisseur. L'expression des différentes protéines a été évaluée par immunobuvardage. Les protéines ont été séparées sur gel de 9% en polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE) et transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF, Millipore). La membrane fut ensuite bloquée dans du TBS-T (20 mM Tris, pH 7,6, 137 mM NaCl et 0,1% Tween 20) contenant 5% de lait pendant 2h à la température de la pièce puis incubée avec les anticorps primaires à 4°C pendant la nuit. Les anticorps primaires furent dilués 1:1000 (voir exceptions) dans du TBS-T selon les recommandations des fabricants. Les anticorps utilisés étaient dirigés contre Akt, pAkt (Thr308), pAkt (Ser473) (tous les trois de Cell Signaling), AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ (Biorbyt), AMPKp Thr172 (Biolabs), β-actine (1:10000, Sigma-Aldrich), CD36 (1:2000, Novus Biologicals), HMGR (Novus Biologicals), HMGRp (ser872) (Bioss), p-P70S6K (Cell Signaling) PCSK9 (1:2000, Abcam), PDZK1 (Novus Biologicals), rLDL (Novus Biologicals), SR-BI (1:2000, Novus Biologicals), SREBP-1 (Santa Cruz) et SREBP-2 (Abcam). La membrane fut ensuite rincée 3 fois avec du TBS-T puis incubée avec les anticorps secondaires anti-IgG de lapin (1:5000, Sigma-Aldrich) ou anti-IgG de souris (1:5000, GE Healthcare Life Sciences) conjugués à la peroxydase de raifort et dilués dans du TBS-T contenant 5% de lait pendant 1h à la température de la pièce. Les membranes furent encore lavées 3 fois avec du TBS-T puis les bandes ont été visualisées avec le réactif Immubilion western chemioluminescent HRP substrat (Millipore). Les bandes furent quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, version 1.6.0).

2.3 Dosage de cholestérol endogène

Afin de tester l'effet de la metformine et de l'AICAR sur la régulation des taux de cholestérol intracellulaire, un dosage du cholestérol total a été effectué. Les cellules MC3T3-E1 ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits jusqu'à une confluence de 80% puis traitées ou non avec de la metformine (1 mM) ou de l'AICAR (2 mM) pendant le temps indiqué en conditions de culture normales. Le dosage de cholestérol a été réalisé avec le kit de dosage *Amplex*® *Red Cholesterol Assay* (Life technologies) selon les recommandations du fabriquant. La quantité de cholestérol est rapportée sur le contenu en protéines des échantillons quantifié par BCA tel que décrit précédemment.

2.4 qRT-PCR

Dans le but de corréler le dosage de protéines avec leur expression en ARNm, ainsi que d'étudier les effets de l'activation de l'AMPK sur l'expression de gènes ostéoblastiques, des PCR ont été réalisées sur les cellules. Après avoir été ensemencées en plaques de 6 puits puis traitées, les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS puis l'ARN fut isolé en utilisant le réactif Ribozol (AMRESCO). L'ARN fut ensuite inversement transcrit avec le *High reverse transcriptase kit* (Biobasics) selon les

recommandations du fabriquant. Les PCR en temps réel (qPCR) ont ensuite été réalisées en utilisant le système de détection *iQ5 real-time PCR* de Biorad. Les amorces du gène runx2 provenaient de Qiagen (QT00102193) alors que les séquences des autres amorces ont été choisies et commandées chez Invitrogen. Ces amorces sont présentées dans le tableau 2.1.

Gène	Sens	· Anti-sens			
micro-	TACTCACGCCACCCACCGGAG	GCTCGGCCATACTGGCATGCT			
globuline					
sr-bi	CAGCCTGACAAGTCGCATGGCTC	AAAAGCACGCTGGCCCATGGTG			
cd36	AGATGACGTGGCAAAGAACAG	CCTTGGCTAGATAACGAACTCTG			
rldl	CGGCTTCCGGTTGGTGGACC	GGACCTCGTGGCGGTTGGTG			
hmgr	TTGGAGTTGGCACCATGTCA	CTCTAGGACCAGCGACACAC			
osx	TTCGCATCTGAAAGCCCACT	TGCGCTGATGTTTGCTCAAG			
collal	GCTTCTTTTCCTTGCGGTTC	ACTTGACCTTCCTGCCTCAG			

Ta	bleau	2.1.	. Séq	uences	des	amorces	pour	les .	PC	CR
----	-------	------	-------	--------	-----	---------	------	-------	----	----

2.5 Mesure de la prolifération cellulaire

Les effets de la metformine et de l'AICAR sur la croissance et la survie cellulaire ont pu être évalués via la mesure de la prolifération. Les cellules ont été ensemencées dans des plaques de 96 puits en conditions de culture normales jusqu'à une confluence de 50%. Les cellules ont ensuite été cultivées durant 24h dans du milieu α -MEM et 2% FBS puis elles ont été traitées avec les concentrations indiquées avec ou sans metformine ou AICAR pendant 72h supplémentaires. Le milieu fut changé chaque jour avec des produits frais. La prolifération cellulaire fut évaluée par une coloration au cristal violet (2% de cristal violet (City chemical) dans 2% éthanol) puis les cellules ont été solubilisées dans du SDS à 1%. La densité optique a été lue à 575 nm.

2.6 Mesure de la migration cellulaire et évaluation du taux mitotique

La migration cellulaire, une fonction importante pour les ostéoblastes, a été évaluée suite au traitement avec les activateurs d'AMPK. Le taux mitotique des cellules a pu être évalué par la même occasion afin de corroborer les mesures de prolifération cellulaire. Les cellules furent ensemencées dans des plaques de 24 puits jusqu'à une confluence de 90% puis ont été traitées avec ou sans metformine ou AICAR selon les concentrations indiquées une heure avant le début de la prise de données. Un trait fut ensuite tracé au milieu du puits de la plaque de culture et des photographies furent prises par microscopie à contraste de phase à intervalles réguliers durant 20h. . Durant la prise des données, les cellules furent maintenues dans l'incubateur du microscope selon les conditions de culture habituelles. La colonisation de l'aire du trait par les cellules fut ensuite analysée avec le logiciel NIS-Elements (Nikon, version Advanced Research). Dans les mêmes conditions de culture, les mitoses ont pu être comptabilisées dans les précédentes photos à l'aide de la fonction object count du logiciel NIS-Elements qui permet de mesurer automatiquement la fréquence d'évènements préalablement sélectionnés, ici les mitoses, dans des photographies de cellules en culture.

2.7 Évaluation de la différenciation cellulaire

Tel que mentionné préalablement, les ostéoblastes ont une capacité de différenciation qui peut être évaluée par différents marqueurs. Nous avons choisi de mesurer l'activité de la phosphatase alcaline et la déposition de calcium. La différenciation cellulaire a été évaluée selon l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) et en fonction de la déposition de calcium. Les cellules ont été ensemencées dans des plaque de 24 puits jusqu'à une confluence de 80% en conditions de culture normales. Le milieu fut ensuite remplacé par du milieu de différenciation (jour 0) durant 21 jours : MEM supplémenté avec 10% FBS, 1% pénicilline-streptomycine, 5 mM de beta-glycérophosphate, 50 µg/ml d'acide ascorbique et avec ou sans metformine ou AICAR aux concentrations indiquées. Le milieu fut changé trois fois par semaine avec les produits nouvellement ajoutés. L'activité de l'ALP fut évaluée par la conversion du paranitrophenylphosphate (p-NPP, Sigma-Aldrich) en para-nitrophenolate (p-NP). Brièvement, les cellules furent rincées deux fois avec du PBS, solubilisées dans du tampon ALPase (200 mM glycine, 2 mM MgCl₂.6H₂O et 2% Triton X-100) et du p-NPP fut ajouté dans les puits. Après une incubation à 37°C, la réaction fut arrêtée avec du NaOH à 1 M puis l'absorbance fut lue à 410 nm. Les résultats sont exprimés en moles de p-NPP réduites par minute par mg de protéines (nmol de p-NPP réduites/min/µg de protéines). Les données furent normalisées sur la quantité de protéines totale déterminée par BCA tel que décrit précédemment. La déposition du calcium fut évaluée par coloration avec le rouge d'alizarine (ARS). Les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS puis fixées à l'aide d'éthanol à 70% glacé durant une heure. Les cellules ont ensuite été colorées avec une solution contenant le rouge d'alizarine (10% chlorure de cétylpyridinium (CPC), 10 mM Na₂HPO₄, 40 mM ARS) puis ont été rincées avec de l'eau pour enlever l'excédent de colorant. Les cellules ont ensuite été solubilisées avec la même solution sans colorant (10% CPC, 10 mM Na₂HPO₄). La densité optique fut ensuite lue à 575 nm. Dans les deux cas, les données

furent normalisées par rapport au jour 0 puis par rapport au contrôle correspondant à chaque temps de différenciation.

2.8 Inhibition de l'expression de l'AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ avec siRNA

Afin de mesurer les effets dépendants et indépendants de l'AMPK de la metformine et de l'AICAR, l'inhibition de l'expression de l'AMPK par un siRNA a été employée. Les cellules furent ensemencées dans des plaques de 6 puits jusqu'à une confluence de 50%. Elles furent ensuite transfectées avec 60 pmols de siRNA dirigés contre l'AMPK α 1/ α 2 et diluées dans l'agent de transfection et le milieu de transfection selon les recommandations du fabriquant (sc-45313, Santa Cruz Biotechnology). Les cellules ont été incubées à 37°C durant 6h pour la transfection. Du milieu de culture contenant 20% de FBS et 20% de pénicilline/streptomycine fut ensuite ajouté pour 18h d'incubation additionnelles. Les cellules furent ensuite traitées ou non avec la metformine à 1 mM ou l'AICAR à 2 mM durant 24h.

2.9 Cultures primaires de MSC

Dans le but de comparer les effets obtenus sur la lignée cellulaire MC3T3-E1 à un modèle plus près de conditions *in vivo*, des cellules ostéoblastiques de souris ont été employées. Pour cette culture d'ostéoblastes et de cellules souches mésenchymales (MSC), des souris mâles C57Bl/6 *wild type* (WT), âgées entre 3 et 4 mois, ont été euthanasiées et leurs tibias et fémurs ont été récoltés. Les os ont été nettoyés des tissus

adhérents, coupés en deux et la moelle osseuse a été extraite par centrifugation à 2500 rpm pendant 5 minutes. Les culots ont été resuspendus dans du milieu α -MEM (Gibco) contenant 20% FBS (Hyclone), 1% de pénicilline et streptomycine (Gibco) et 0,1% de fungizone (Gibco) et ensemencés dans les pétris de culture à 37°C en présence de 5% de CO₂. Après 7 jours, les cellules ont été rincées avec du PBS et les cellules non adhérées ont été éliminées. Les cellules restantes ont été maintenues en culture en conditions normales jusqu'à une confluence de 90% puis elles ont été récupérées grâce à de la trypsine 0,05% (Invitrogen) puis réensemencées dans des plaques de 6 puits. Le milieu fut changé deux fois par semaine jusqu'au traitement des cellules tel qu'indiqué dans les légendes des figures. Les animaux ont été hébergés, nourris et manipulés selon les exigences du comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) de l'UQÀM et selon les lignes directrices du CCPA.

2.10 Analyses statistiques

Les données furent analysées avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, version 7). Des tests de t Student, des analyses de variances (ANOVA) avec posttest Dunnett ou une analyse de variance à deux facteurs suivie d'un post-test Bonferroni ont été utilisés selon le cas. Les moyennes \pm SEM furent considérées statistiquement différentes du contrôle avec une p-value égale ou inférieure à 0,05.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Activation de l'AMPK par la metformine et l'AICAR

Afin de constater les effets de l'activation de l'AMPK par la metformine et l'AICAR dans les cellules ostéoblastiques, nous avons d'abord voulu confirmer que la metformine et l'AICAR activaient bel et bien l'AMPK en augmentant sa phosphorylation dans les cellules MC3T3-E1. Les cellules ont donc été traitées et la phosphorylation de l'AMPK est observable avec des concentrations aussi faibles que 0,01 mM de metformine et d'AICAR (figure 3.1A). Toutefois, des concentrations plus importantes sont requises pour obtenir des résultats significatifs (figure 3.1A). Les concentrations de 1 mM pour la metformine et 2 mM pour l'AICAR ont donc été choisies pour la suite des expériences. Ces concentrations augmentent l'expression de l'AMPKp de 77% et 111%. De plus, l'AICAR à 2 mM augmente la forme phosphorylée de l'AMPK de façon plus importante que la metformine à 1 mM (figure 3.1B). Ces concentrations mènent à la phosphorylation de l'AMPK dès 5 minutes de traitement mais des résultats significativement différents du contrôle sont obtenus après 24h de traitement avec la metformine et l'AICAR avec des augmentations de 22 et 32% (figure 3.1A). Le traitement de 24h avec les concentrations choisies n'affecte pas la viabilité cellulaire et en accord, la quantité de protéines dans les échantillons n'est pas altérée de façon significative (figure 3.2B). Le nombre de cellules est également stable après 24h de traitement avec la metformine et l'AICAR (figure 3.2C).



Figure 3.1. Effets de la metformine et de l'AICAR sur la phosphorylation de l'AMPK. A et B: Les cellules MC3T3-E1 ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits jusqu'à une confluence de 80%. Elles ont ensuite été traitées avec de la metformine (m) ou de l'AICAR (a) pendant 15 minutes avec les concentrations indiquées puis des immunobuvardages contre l'AMPKp (Thr172) ont été réalisés (n=3). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. A: Résultats significativement différents des résultats obtenus pour le contrôle (c) suite à une analyse de variance suivie d'un post test Dunnett, * : p \leq 0,05, ** : p \leq 0,01. B: Résultats significativement différents du contrôle suite à un test t de Student, ^{#, &} : p \leq 0,05, ^{##} : p \leq 0,01.



Figure 3.2. Effets du temps de traitement sur la phosphorylation de l'AMPK par la metformine et l'AICAR. Les cellules MC3T3-E1 ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits jusqu'à une confluence de 80%. A: Elles ont ensuite été traitées avec 1 mM de metformine (m) ou 2 mM d'AICAR (a) pendant le temps indiqué. Puis des immunobuvardages contre l'AMPKp (Thr172) et l'AMPK totale ont été réalisés (n=3). B: Les protéines totales des extraits cellulaires ont été quantifiées après 24h de traitement avec de la metformine ou de l'AICAR (n=8). C: La prolifération cellulaire a été évaluée par une coloration au cristal violet après 24h de traitement tel que décrit dans la section Matériel et méthodes (n=3). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. A: Résultats significativement différents des résultats obtenus pour le contrôle (c) suite à une analyse de variance suivie d'un post test Dunnett, ** : p \leq 0,01. B et C: Résultats non significativement différents des résultats obtenus pour le contrôle suite à une analyse de variance suivie d'un post test Dunnett, ** : p \leq 0,01.

Modulation du métabolisme du cholestérol par la metformine et l'AICAR

Considérant nos hypothèses de départ stipulant que l'activation de l'AMPK pourrait avoir des effets sur les cellules ostéoblastiques en modifiant le métabolisme du cholestérol, nous nous sommes intéressés aux effets de la metformine et de l'AICAR sur la synthèse de cholestérol. Nous avons donc mesuré l'expression de l'HMGR, l'enzyme principale de la synthèse de cholestérol, et la quantité de cholestérol total dans les cellules MC3T3-E1 (figures 3.3 et 3.4). Nous avons observé que la metformine n'affecte pas l'expression de cette enzyme clé de la synthèse endogène de cholestérol. L'expression de la protéine HMGR, de sa forme phosphorylée (HMGRp) et de son ARNm n'est également pas modulée de façon significative par la metformine (figure 3.3A et B). Ceci se traduit également en une quantité de cholestérol total non modulée après le traitement avec la metformine (figure 3.3C). L'AICAR diminue toutefois significativement l'expression de la protéine HMGR (72%) et de son ARNm (77%) et augmente la forme phosphorylée de la protéine (89%) après 24h de traitement (figure 3.4A et B). La quantité totale de cholestérol est ainsi diminuée après 1h (30%), 6h (19%) et 24h (21%) de traitement (figure 3.4C).

Effets de la metformine et de l'AICAR sur les SREBPs

Suite aux modifications observées dans le métabolisme du cholestérol, nous avons ciblé des voies impliquées dans cette signalisation. Les SREBPs sont une famille importante de facteurs de transcription régulant des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (Horton et Shimomura, 1999). Nous avons donc investigué les effets de la metformine et de l'AICAR sur leur expression.



Metformine 1 mM

Figure 3.3. Modulation du métabolisme du cholestérol par la metformine. Les cellules MC3T3-E1 ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits jusqu'à une confluence de 80%, elles ont ensuite été traitées avec 1 mM de metformine pendant le temps indiqué. A: La quantification des protéines HMGR et HMGRp (Ser872) a été réalisée par immunobuvardage (n=3-4). B: La quantification de l'ARNm d'HMGR a été effectuée par qRT-PCR tel que décrit dans la section Matériel et méthodes (n=3). C: Le dosage de cholestérol (CHOL) a été réalisé tel que décrit dans la section Matériel et méthodes (n=3). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. Résultats non significativement différents des résultats obtenus pour le contrôle (c) suite à une analyse de variance suivie d'un post-test Dunnett.



AICAR 2 mM

Figure 3.4. Modulation du métabolisme du cholestérol par l'AICAR. Les cellules MC3T3-E1 ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits jusqu'à une confluence de 80%, elles ont ensuite été traitées ou non avec 2mM d'AICAR pendant le temps indiqué. A: La quantification des protéines HMGR et HMGRp (Ser872) a été réalisée par immunobuvardage (n=3-4). B: La quantification de l'ARNm d'HMGR a été effectuée par qRT-PCR tel que décrit dans la section Matériel et méthodes (n=3). C: Le dosage de cholestérol (CHOL) a été réalisé tel que décrit dans la section Matériel et méthodes (n=3). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. Résultats statistiquement différents des résultats obtenus pour le contrôle (c) suite à une analyse de variance suivie d'un post-test Dunnett, * : p \leq 0,05, ** : p \leq 0,01. Dans les cellules MC3T3-E1, la metformine augmente de façon optimale l'expression du précurseur de SREBP-2 de 172% et la forme mature de 114% dès 15 minutes de traitement puis cet effet s'atténue jusqu'à 24h de traitement où l'augmentation équivaut à 51% pour la forme immature et 46% pour la forme mature (figure 3.5). La forme mature et le précurseur de SREBP-2 peuvent être détectés avec le même anticorps et différenciés selon leur poids moléculaire différent. L'AICAR augmente également l'expression du précurseur et de la forme mature de SREBP-2 de respectivement 73% et 188% après 1h de traitement et de 86% et 248% après 6h de traitement (figure 3.5).

L'expression de la forme mature de SREBP-1 est également augmentée par la metformine et l'AICAR (figure 3.6). La metformine augmente son expression de 87% après 15 minute puis jusqu'à un maximum de 104% après 1h de traitement, alors que l'AICAR provoque une augmentation de 58% après 5 minutes puis une augmentation maximale de 136% après 6h de traitement (figure 3.6). Nous n'avons pas évalué l'expression du précurseur de SREBP-1 considérant que la forme mature est également la forme active de la protéine.

Modulation de l'expression des récepteurs de lipoprotéines par la metformine et l'AICAR

Considérant que le métabolisme du cholestérol est affecté par la synthèse *de novo* et par sa captation via les lipoprotéines (revu par Sato et Takano, 1995), nous avons investigué les effets de l'activation de l'AMPK sur l'expression de différents récepteurs de lipoprotéines précédemment identifiés dans les cellules MC3T3-E1, soient le rLDL (Haÿ *et al.*, 2009) et les SR-BI et CD36 (Brodeur *et al.*, 2008a). La metformine n'affecte pas significativement l'expression de la protéine rLDL ni de son ARNm dans

les cellules MC3T3-E1 (figure 3.7). D'un autre côté, l'expression de la protéine rLDL est augmentée significativement de 59%, 79% et 51% respectivement après 1h, 6h et 24h de traitement avec l'AICAR, bien que son ARNm ne soit pas modulé (figure 3.7).



Figure 3.5. Effets de la metformine et de l'AICAR sur l'expression de SREBP-2. Les cellules MC3T3-E1 ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits jusqu'à une confluence de 80%. Elles ont ensuite été traitées avec 1mM de metformine ou 2 mM d'AICAR pendant les temps indiqués puis des immunobuvardages ont été réalisés contre SREBP-2 (n=3). Le précurseur et la forme mature de la protéine SREBP-2 peuvent être détectés avec le même anticorps et différenciés par leurs poids moléculaires différents (respectivement 120 et 68 kDa). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. Résultats statistiquement différents de ceux obtenus avec le contrôle (c) après un test t de Student, * : $p \le 0,05$, ** : $p \le 0,01$, ***: $p \le 0,001$.









Tant avec le traitement à la metformine (1 mM) qu'avec celui à l'AICAR (2 mM), l'expression de la protéine PCSK9, un régulateur post-traductionnel du rLDL (Lambert *et al.*, 2009), dans le milieu de culture et dans les extraits cellulaires n'est pas modulée (données non illustrées).

Le taux protéique de SR-BI n'est pas affecté par la metformine ni par l'AICAR (figure 3.8). Cette même figure démontre toutefois que l'AICAR, et non la metformine, diminue l'expression de l'ARNm de SR-BI de 39% après 1h et de 51% après 24h de traitement (figure 3.8). Bien que les résultats ne soient pas significativement différents, nous avons observé, après un traitement avec de la cycloheximide, un inhibiteur de la traduction (Schneider-Poetsch *et al.*, 2010), que l'AICAR stabilise la forme protéique de SR-BI. En effet, une combinaison de cycloheximide et d'AICAR minimise la diminution de la forme protéique de SR-BI par la cycloheximide seule de 46% après 6h et de 27% après 24h de traitement (figure 3.9). Ces résultats pourraient expliquer les plus faibles niveaux d'ARNm alors que les niveaux de protéines sont inchangés (figure 3.7). La protéine PDZK1, un régulateur post-traductionnel de SR-BI (Nakamura *et al.*, 2005), n'est pas modulée dans les cellules MC3T3-E1 tant avec de l'AICAR que de la metformine (données non illustrées). Finalement, la forme protéique de CD36 est augmentée de 242% après 24h de traitement avec de la metformine, bien que l'ARNm ne soit pas modulé. L'AICAR n'affecte pas l'expression de CD36 (figure 3.10).

Effets de la metformine et de l'AICAR sur la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire étant un processus anabolique est, selon la littérature, inhibée suite à l'activation de l'AMPK (revu par Viollet *et al.*, 2012). Toutefois, plusieurs équipes ont observé des effets positifs sur la prolifération des cellules MC3T3-E1 après






Figure 3.9. Effets de l'AICAR sur la traduction de SR-BI. Les cellules MC3T3-E1 ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits jusqu'à une confluence de 80%. Elles ont ensuite été traitées ou non avec de la cycloheximide (cyclo) durant 30 minutes puis avec de l'AICAR (a) à 2 mM seul ou en combinaison avec la cycloheximide pendant les temps indiqués. Des immunobuvardages ont ensuite été réalisés contre SR-BI (n=2). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. Résultats obtenus avec la cycloheximide (cyclo) non significativement différents des résultats obtenus en combinaison avec l'AICAR (a 2 mM + cyclo) suite à test t de Student.

traitement à la metformine ou à l'AICAR (Cortizo *et al.*, 2006; Kanazawa *et al.*, 2009). Nous avons donc voulu valider le modèle par nous-mêmes. La prolifération des cellules MC3T3-E1 est augmentée de façon significative par 0,01 mM de metformine (11%) et 0,01 mM d'AICAR (7%), mais diminuée par 1 mM de metformine (7%) et 2 mM d'AICAR (14%) après 72h de traitement (figure 3.11A). Le taux mitotique est également augmenté de 11 et 25% avec 0,01 mM de metformine et 0,01 mM d'AICAR (figure 3.11B). La metformine à 1 mM n'affecte pas le taux mitotique alors que l'AICAR à 2 mM le diminue de 29% (figure 3.11B). Ces résultats concordent avec la phosphorylation de l'AMPK inchangée avec 0,01 mM de metformine et d'AICAR mais augmentée de 75% avec 1 mM de metformine et de 150% avec 2 mM d'AICAR



Figure 3.10. Effets de la metformine et de l'AICAR sur l'expression de CD36. Les cellules MC3T3-E1 ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits jusqu'à une confluence de 80%. Elles ont ensuite été traitées avec de la metformine ou de l'AICAR avec les concentrations et pendant les temps indiqués puis des immunobuvardages ont été réalisés contre CD36 (n=3). La quantification de l'ARNm a été réalisée par qRT-PCR tel que décrit dans la section Matériel et méthodes (n=4-6). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. Résultats statistiquement différents des résultats obtenus avec le contrôle (c) suite à une analyse de variance suivie d'un post-test Dunnett, ** : $p \le 0,01$.

(figure 3.11C). Ces résultats montrent donc que l'AMPK, lorsque phosphorylée suite à un traitement avec de la metformine ou de l'AICAR, diminue la prolifération des cellules MC3T3-E1. D'un autre côté, les mêmes produits à une concentration plus faible ne provoquent plus l'activation de l'AMPK et la prolifération cellulaire est alors augmentée.

Puisqu'il est suggéré que l'AMPK ait des effets sur la prolifération cellulaire via l'inhibition du complexe mTORC1 et que celui-ci est un joueur clé dans le métabolisme énergétique (Gwinn *et al.*, 2008), nous avons investigué les effets de la metformine et de l'AICAR sur l'activation de ce complexe. De façon étonnante, la metformine et l'AICAR à faible ou à forte concentration ont provoqué une augmentation de 22 à 63% de la forme phosphorylée et active de la protéine p70S6K (P-p70S6K), cible directe du complexe mTORC1, après 15 minutes de traitement (figure 3.12). Les effets sur le complexe mTORC1 ont été confirmés avec l'ajout d'insuline et de rapamycine, qui sont respectivement activateur (revu par Hara *et al.*, 2002) et inhibiteur (revu par Thoreen et Sabatini, 2009) de ce complexe. L'insuline augmente effectivement la phosphorylation de la protéine p70S6K de 69%, alors que la rapamycine inhibe totalement sa phosphorylation après 15 minutes de traitement et ce, même avec un co-traitement avec la metformine à 1 mM ou l'AICAR à 2 mM (figure 3.12).



Figure 3.11. Effets de la metformine et l'AICAR sur la prolifération cellulaire. A: Les cellules MC3T3-E1 ont été ensemencées dans des plaques de 96 puits jusqu'à une confluence de 50%. Le milieu a ensuite été changé par du α -MEM avec 2% FBS pendant 24h puis les cellules ont été traitées avec de la metformine (m) ou de l'AICAR (a) avec les concentrations indiquées pendant 72h. Le milieu fut changé à tous les jours. La prolifération cellulaire a été évaluée par une coloration au cristal violet tel que décrit dans la section Matériel et méthodes (n=6). B: Le taux mitotique a été évalué par comptage des mitoses avec le logiciel NIS-Elements après une prise de photos à un intervalle régulier pendant 20h. C: Les cellules ont été traitées avec de la metformine ou de l'AICAR aux concentrations indiquées pendant 15 minutes. Les protéines ont ensuite été extraites pour immunobuvardage contre l'AMPKp (Thr172) (n=3). Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM. Résultats significativement différents de ceux obtenus avec le contrôle (c) après un test t de Student, *, #, & : p ≤ 0,05, **, ## : p ≤ 0,01.



Figure 3.12. Effets de la metformine et l'AICAR sur le complexe mTORC1. Les cellules ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits jusqu'à une confluence de 80%. Elles ont ensuite été incubées avec 2% de FBS pendant 24h puis traitées avec de la metformine (m) ou de l'AICAR (a) avec les concentrations indiquées pendant 15 min. De l'insuline (100 mM) et la rapamycine (10 nM) ont été ajoutées dans le milieu de culture 1h avant la metformine et l'AICAR. Les protéines ont ensuite été extraites pour immunobuvardage contre la protéine P-p70S6K (n=5). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. Résultats significativement différents de ceux obtenus avec le contrôle (c) après un test t de Student, ** : p \leq 0,01, *** : p \leq 0,001.

Effets de la metformine et de l'AICAR sur l'Akt

Les fortes concentrations de metformine et d'AICAR conduisent à une phosphorylation de l'AMPK de façon significative alors que les faibles concentrations ne conduisent pas à une phosphorylation significative (figure 3.9C). On conclut donc que bien que ces produits activent le complexe mTORC1, cet effet serait indépendant de l'AMPK,

63

le complexe mTORC1 étant activé peu importe la concentration de metformine ou d'AICAR. Nous avons donc tenté de trouver une autre voie par laquelle le complexe mTORC1 serait modulé à la hausse suite au traitement des cellules. L'Akt est une des principales voies par laquelle le complexe mTORC1 est activé (revu par Inoki *et al.*, 2006), nous avons donc étudié cette voie après un traitement à la metformine ou l'AICAR. Nous avons remarqué que l'AICAR augmente la phosphorylation d'Akt sur la Thr308 à raison de 54 et 87% avec 0,01 et 2 mM (figure 3.13). La Ser473 d'Akt est quant à elle phosphorylée par les traitements à la metformine à 1 mM (71%), l'AICAR à 0,01 mM (73%) et l'AICAR à 2 mM (140%). Le niveau d'Akt totale n'est pas modulé par les traitements, sauf dans le cas d'un traitement à l'AICAR à 0,01 mM qui diminue son expression de 12% (figure 3.13).

Effets de la metformine et de l'AICAR sur la migration cellulaire

Lors du remodelage osseux, les ostéoblastes sont appelés à migrer au site de résorption pour y former la nouvelle matrice osseuse (revu par Kohli et Kohli, 2011). Il a également été prouvé que les cellules MC3T3-E1, injectées dans des souris ayant des lésions osseuses, migrent vers ces lésions osseuses et participent à la réparation de l'os (Gibon *et al.*, 2012). Nous avons donc voulu élucider les effets de la metformine et de l'AICAR sur la migration des cellules MC3T3-E1. La migration des cellules est accélérée de 9% avec un traitement à la metformine à 0,01 mM alors qu'un traitement à la metformine à 1 mM ne l'affecte pas de façon significative. L'AICAR à une concentration de 0,01 mM et 2 mM ralentit la migration cellulaire respectivement de 20 et 43% (figure 3.14).



Figure 3.13 : Effet de la metformine et de l'AICAR sur l'Akt. Les cellules MC3T3-E1 ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits jusqu'à une confluence de 80%. Elles ont ensuite été incubées avec 2% de FBS pendant 24h puis traitées avec de la metformine (m) ou de l'AICAR (a) avec les concentrations indiquées pendant 15 min. Les protéines ont ensuite été extraites pour immunobuvardage contre l'Akt totale (n=5), l'Aktp (Thr308 ou T308) (n=5) et l'Aktp (Ser473 ou S473) (n=5). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. Résultats significativement différents des résultats obtenus avec le contrôle (c) après un test t de Student, $*: p \le 0,05, ***: p \le 0,001$.



Figure 3.14 : Effets de la metformine et l'AICAR sur la migration cellulaire. Les cellules MC3T3-E1 ont été ensemencées dans des plaques de 24 puits jusqu'à une confluence de 90%. Un trait fut ensuite tracé au centre de chaque puits à l'aide d'un embout de pipette. Puis, les cellules ont été traitées avec de la metformine (m) ou de l'AICAR (a) aux concentrations indiquées. La migration cellulaire fut évaluée par prises de photos à intervalle régulier durant 20h, puis les données ont été analysées avec le logiciel NIS-Elements. Grossissement total de 100x. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. Résultats significativement différents de ceux obtenus avec le contrôle (c) après un test t de Student (n=5), ** : p \leq 0,01, ***: p \leq 0,001.

Modulation de l'expression de gènes ostéoblastiques par la metformine et l'AICAR

De façon plus générale, nous avons ensuite investigué les effets des deux produits sur l'expression de l'ARNm de gènes nécessaires à la différenciation ostéoblastique tels que runx2, osx (revu par Komori, 2006) et le collagène de type I alpha 1 (col1a1) (Quarles *et al.*, 1992). Dans les cellules MC3T3-E1, la metformine augmente l'expression des gènes runx2 (199%) et osx (119%) après 6h de traitement, ainsi que l'expression de col1a1 de 300% et 338% après 6 et 24h de traitement (figure 3.15). L'expression du gène col1a1 est également augmentée significativement de 214% après 24h de traitement avec l'AICAR (figure 3.15). La metformine semble donc être favorable à la différenciation cellulaire en augmentant l'expression de gènes essentiels à ce phénomène, alors que les effets de l'AICAR ne sont pas aussi clairs.

Effets de la metformine et de l'AICAR sur la différenciation cellulaire

Après avoir investigué les effets aigus de la metformine et de l'AICAR sur les cellules MC3T3-E1, nous avons voulu étudié les effets d'une exposition à plus long terme sur la différenciation cellulaire. Tel que mentionné précédemment, ces cellules préostéoblastiques sont un bon modèle pour étudier la différenciation ostéoblastique puisqu'elles ont une capacité de se différencier de façon analogue aux ostéoblastes *in vivo* lorsqu'exposées aux bonnes conditions de culture (Quarles *et al.*, 1992). En effet, lorsque les cellules cessent de proliférer, elles entament leur différenciation. La phosphatase alcaline (ALP) est un marqueur précoce de la différenciation des préostéoblastes (Quarles *et al.*, 1992). L'ALP est cruciale au processus de la minéralisation de la matrice osseuse (revu par Clarke, 2008). D'un autre côté, la minéralisation de la matrice ainsi que la déposition de calcium surviennent plus tardivement dans le



Figure 3.15. Effets de la metformine et de l'AICAR sur l'expression de gènes ostéoblastiques. Les cellules ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits jusqu'à une confluence de 80%. Elles ont ensuite été traitées avec de la metformine ou de l'AICAR aux concentrations et pendant temps indiqués. La quantification de l'expression des gènes runx2, osx et collal fut réalisée par qRT-PCR tel que décrit dans la section Matériel et méthodes (n=4-6). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. Résultats significativement différents des résultats obtenus avec le contrôle (c) après une analyse de variance suivie d'un post-test Dunnett, * : $p \le 0.05$, **: $p \le 0.01$.

processus de différenciation, soit autour du 9^e jour (Quarles *et al.*, 1992). La littérature sur les effets de la metformine et de l'AICAR n'était pas très exhaustive quant aux conditions de culture et aux méthodes et temps d'exposition des cellules aux produits, nous avons donc établi notre propre protocole durant lequel les cellules sont exposées aux produits fraichement ajoutés dans le milieu durant toute la période de différenciation (voir la section Matériel et méthodes).

Nous nous sommes d'abord assuré que les conditions de culture choisies induisaient bel et bien la différenciation des cellules. En effet, après l'arrêt de la prolifération des cellules, celles-ci ont développé une forme plutôt cubique et l'activité de l'ALP ainsi que la déposition de calcium ont augmenté de façon croissance en fonction du temps jusqu'à 21 jours dans les puits contrôles (ces données ne sont pas illustrées), comme le modèle le prédisait (Quarles *et al.*, 1992). Nous avons ensuite constaté que la metformine à 0,01 mM augmente de façon significative l'activité de l'ALP après 21 jours de culture alors que la metformine à 1 mM l'augmente après 7 jours mais cet effet n'est pas conservé par la suite (figure 3.16). La metformine n'affecte toutefois pas la déposition de calcium dans les cellules MC3T3-E1. L'AICAR d'un autre côté, n'a pas d'effet sur la différenciation cellulaire lorsqu'employé à 0,01 mM mais la concentration de 2 mM induit la mortalité des cellules après plus de 7 jours de culture (figure 3.16).



Figure 3.16. Effets de la metformine et de l'AICAR sur la différenciation cellulaire. Les cellules MC3T3-E1 ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits en conditions de culture normales jusqu'à une confluence de 90%. Les cellules ont ensuite été différenciées durant 0, 7, 14 ou 21 jours tel que décrit dans la section Matériel et méthodes en présence de metformine (m) ou d'AICAR (a) aux concentrations et pendant les temps indiqués. L'activité de l'ALP est évaluée par la quantité de *p*-NPP réduit tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. La déposition du calcium est évaluée par coloration avec le rouge d'alizarine tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. La section Matériel et méthodes. Les données sont normalisées par rapport au jour 0 puis par rapport au contrôle correspondant. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM (n=3). Résultats significativement différents de ceux obtenus avec le contrôle après une analyse de variance à deux facteurs suivie d'un post-test Bonferroni. * : $p \le 0,05$. Note : les cellules n'ont pas survécu plus de 7 jours en présence d'AICAR à 2 mM.

Effets de la metformine et de l'AICAR sur les MSC de souris C57BI/6

Nous avons voulu comparer les effets de la metformine et de l'AICAR sur les cellules MC3T3-E1 à un modèle plus près d'un modèle *in vivo*, nous avons donc isolé des MSC

de souris et les avons traitées avec de la metformine et de l'AICAR. Tout d'abord, nous avons confirmé que la metformine à 1 mM et l'AICAR à 2 mM phosphorylent significativement l'AMPK (figure 3.17). Ceci est effectivement le cas, ces produits augmentent le taux de phosphorylation de respectivement 60 et 86% après 15 minutes de traitement (figure 3.17). Tout comme dans les cellules MC3T3-E1, la metformine ne module pas l'expression de la protéine HMGR (figure 28). L'AICAR à 2 mM augmente toutefois sa forme phosphorylée de 97% après 24h de traitement, bien que la forme totale de la protéine ne soit pas modulée de façon significative (figure 3.17). Nous avons ensuite remarqué une augmentation de l'expression du rLDL avec la metformine (39%) et l'AICAR (135%). La forme protéique de SR-BI est également fortement augmentée par le traitement avec l'AICAR (268%) après 24h (figure 3.17). Nous n'avons malheureusement pas réussi à trouver les conditions optimales pour réaliser un immunobuvardage de qualité contre CD36 avec les cultures primaires.



Figure 3.17. Effets de la metformine et l'AICAR sur les MCS. Les MSC de souris C57Bl/6 ont été isolées tel que décrit dans la section Matériel et méthodes, puis les cellules ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits jusqu'à une confluence de 80%. Les cellules ont ensuite été traitées avec 1mM de metformine (m) ou 2 mM d'AICAR (a) durant 24h. Les protéines ont ensuite été extraites et des immunobuvardages ont été réalisés contre l'AMPKp (Thr172), l'AMPK totale, l'HMGR, le rLDL et le SR-BI (n=3). Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM. Résultats significativement différents de ceux obtenus avec le contrôle après un test t de Student. * : $p \le 0.05$, ** : $p \le 0.01$, ***: $p \le 0.001$.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les cellules MC3T3-E1, une lignée de pré-ostéoblastes issus de calvarium de souris, ont été choisies comme modèle pour les expériences puisqu'elles sont reconnues pour être un modèle pratique et physiologiquement représentatif de cultures primaires ostéoblastiques. De plus, ces cellules immatures ont la capacité de se différencier en ostéoblastes lorsque stimulées dans les bonnes conditions et leur profile d'expression de gènes ostéoblastiques est comparable à celui des cultures primaires (revu par Bilezikian *et al.*, 2002). Nous avons par la suite confirmé certains résultats dans des cultures primaires de MSC issues de moelle osseuse de souris C57Bl/6 WT.

L'objectif principal de ce projet était d'étudier les effets de l'activation de l'AMPK sur le métabolisme du cholestérol et sur diverses fonctions normales des cellules ostéoblastiques. Pour ce faire, nous avons employé deux produits pour déclencher cette activation de l'AMPK : la metformine, un inhibiteur de la chaine de transport des électrons produisant une baisse du pool d'ATP et l'AICAR, un analogue synthétique de l'AMP. Nous avons donc tout d'abord voulu constater que ces produits menaient à l'activation de l'AMPK et tel qu'attendu, la metformine et l'AICAR induisent la phosphorylation de l'AMPK dans les cellules MC3T3-E1 (figure 3.1 et 3.2) et dans les MSC (figure 3.17) de façon significative avec des concentrations de 1 et 2 mM. Ces concentrations avaient préalablement été employées dans les cellules MC3T3-E1 (Kasai *et al.*, 2009), nous les avons donc utilisées pour étudier les effets de l'activation de l'AMPK. Il avait été démontré que l'AICAR induit une phosphorylation de l'AMPK

plus importante que la metformine (Zhou *et al.*, 2001), ce que nous avons également confirmé dans notre modèle (figure 3.1). Les plus faibles concentrations (0,01 mM), mimant les concentrations physiologiques de metformine chez des patients diabétiques (revu par Zhou *et al.*, 2001), ont également été employées pour exposer les cellules à plus long terme et corroborer des résultats obtenus par d'autres équipes avec ces mêmes faibles concentrations (Cortizo *et al.*, 2006; Kanazawa *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2010).

Considérant notre hypothèse de départ, nous avons, en second lieu, déterminé les effets de l'activation de l'AMPK sur le métabolisme du cholestérol dans les ostéoblastes. Pour ce faire, nous avons employé la metformine et l'AICAR et avons évalué leurs effets sur l'expression de l'HMGR, enzyme principale de la synthèse de cholestérol de novo. Considérant que les concentrations de cholestérol intracellulaires dépendent à la fois de la synthèse de novo et de la captation à partir des lipoprotéines (Berg et al., 2002), nous avons également dosé le cholestérol intracellulaire total ainsi que l'expression de récepteurs de lipoprotéines présents dans les cellules MC3T3-E1, soient le rLDL, le CD36 et le SR-BI (Brodeur et al, 2008b). Contrairement au rôle bien connu de l'activation de l'AMPK dans le foie pour diminuer l'expression de l'HMGR (Corton et al., 1994; Henin et al., 1995), la metformine n'a pas eu d'effet sur l'HMGR dans les cellules MC3T3-E1 (figure 3.3) ni dans les MSC (figure 3.17). La metformine agit principalement au niveau du foie (Wilcock et Bailey, 1994) puisqu'elle est internalisée dans les cellules via l'OCT1 et que celui-ci est principalement exprimé dans le foie (Shu et al., 2007). Il a été démontré que les ostéoblastes de rats expriment OCT1 et que celui-ci permet l'internalisation de la metformine (Ma et al., 2009). Toutefois, l'expression accrue de l'OCT1 dans le foie pourrait expliquer les effets moins notables de la metformine sur l'HMGR dans les ostéoblastes. Dans ces circonstances, il aurait été pertinent de valider l'expression du transporteur OCT1 par les cellules MC3T3-E1, ce qui ne semble pas avoir été fait au préalable dans la littérature. De plus, nous sommes les premiers à avoir étudié des déterminants de la synthèse endogène de cholestérol suite à un traitement à la metformine ou l'AICAR dans des modèles ostéoblastiques, il est donc difficile de comparer avec des résultats déjà obtenus. D'autres équipes n'avaient également pas observé d'effet de 0.05 mM de metformine sur l'expression d'HMGR dans des cultures primaires issues de foies de rats (Scott et Tomkin, 1983; Zhou et al., 2001). Ces résultats laissent supposer une activité AMPK indépendante de la metformine. L'AICAR a toutefois entrainé une baisse de l'expression de l'HMGR et conséquemment, une diminution du cholestérol intracellulaire dans les cellules MC3T3-E1 (figure 3.14). Bien que le taux de la protéine totale ne soit pas modifié dans les MSC, l'AICAR a provoqué une augmentation de la forme phosphorylée de la protéine HMGR (figure 3.17) tout comme dans les cellules MC3T3-E1 (figure 3.4). Ces résultats corroborent ceux obtenus précédemment par notre équipe dans les cellules HepG2, une lignée de cellules de carcinome hépatique humain, et dans les foies de souris C57Bl/6 traitées à l'AICAR (données non illustrées). Ces effets de l'AICAR sur la diminution de la synthèse de cholestérol, suite à l'activation de l'AMPK dans le foie, sont également bien reconnus dans la littérature (ElAzzouny et al., 2015; Henin et al., 1995; Leclerc et al., 1998). On peut supposer que ces effets de l'AICAR découlent d'une plus grande phosphorylation de l'AMPK comparativemet à la metformine (figure 3.1).

La diminution de la synthèse endogène de cholestérol ainsi que la diminution de sa concentration dans les cellules MC3T3-E1 après le traitement à l'AICAR (figure 3.4) pourraient expliquer l'augmentation de l'expression du rLDL par le même traitement (figure 3.7). En effet, tel que préalablement décrit, les cellules s'approvisionnent en cholestérol via la synthèse endogène et via la captation à partir des lipoprotéines (Berg *et al.*, 2002). Une diminution dans la synthèse endogène et *vice versa* (revu par Sato et Takano, 1995). L'augmentation du rLDL après un traitement à l'AICAR dans les cellules HepG2 a d'ailleurs déjà été rapportée par d'autres laboratoires (Yashiro *et al.*,

2013) ainsi que par d'autres membres de notre laboratoire dans les cellules HepG2 et dans les hépatocytes de souris C57BL/6 (ces données ne sont pas illustrées). La baisse de cholestérol endogène est également un activateur de l'expression de SREBP-2 (revu par Horton *et al.*, 2002) qui à son tour augmente l'expression du rLDL (Brown et Goldstein, 1997). L'AICAR augmente d'ailleurs l'expression de la protéine SREBP-2 dans notre modèle (figure 3.5). Nous avons toutefois été surpris que la metformine n'ait pas le même effet sur le rLDL que l'AICAR, l'expression de celui-ci étant inchangée (figure 3.7), cette différence pourrait être due au fait que la metformine (figure 3.3) contrairement à l'AICAR (figure 3.4) n'a pas modulé le cholestérol endogène dans les cellules MC3T3-E1. La metformine augmente toutefois l'expression du rLDL dans les MSC de souris bien que l'expression de l'HMGR soit inchangée (figure 3.17), phénomène qui demeure plutôt inexpliqué.

Le cholestérol étant indispensable à l'intégrité de la membrane cellulaire et à de multiples voies de signalisation (revu par Okayasu *et al.*, 2012), la diminution de sa concentration intracellulaire induite par 2 mM d'AICAR (figure 3.4) pourrait expliquer en partie la baisse de prolifération observée (figure 3.11) ainsi que la diminution de la migration des cellules MC3T3-E1 (figure 3.14). Le cholestérol est en effet essentiel à la progression du cycle cellulaire et il semble que le cholestérol s'accumule dans les cellules en phase S et que l'inhibition de la biosynthèse de cholestérol freine les cellules en phase G1 (Singh *et al.*, 2013). Différentes études associent également les taux de cholestérol intracellulaire à la prolifération cellulaire (revu par Dessì *et al.*, 1988). Par ailleurs, le cholestérol est nécessaire à des voies de signalisation impliquées dans la régulation de la motilité cellulaire et dans l'organisation du cytosquelette (Ramprasad *et al.*, 2007). Il semble donc que les concentrations endogènes de cholestérol doivent être régulées de façon précise par les cellules et que les effets du cholestérol exogène soient grandement influencés par le mode de livraison, le type de cholestérol et bien

sûr le type cellulaire étudié. Pour toutes ces raisons, il n'est pas étonnant que la diminution de cholestérol endogène induite par l'AICAR à 2 mM ait des effets négatifs sur la prolifération et la migration des cellules MC3T3-E1. Dans le même ordre d'idées, la modulation du métabolisme du cholestérol pourrait être à l'origine de certaines différences entre la metformine et l'AICAR dans les résultats obtenus. La metformine à 1 mM, contrairement à l'AICAR à 2 mM, n'a pas modulé le cholestérol (figure 3.3). Conséquemment, la migration (figure 3.14) et le taux mitotique (figure 3.11) des cellules traitées à la metformine restent inchangés et bien que la prolifération cellulaire soit légèrement diminuée, cette diminution est moindre que celle engendrée par l'AICAR (figure 3.11). Finalement, l'activation de l'AMPK, indépendamment de l'inhibition de l'HMGR, freine la migration cellulaire pourraient donc s'expliquer par une phosphorylation plus importante de l'AMPK avec l'AICAR qu'avec la metformine (figure 3.1).

Un autre phénomène observé dans les cellules MC3T3-E1 après les traitements avec la metformine et l'AICAR est l'augmentation de l'expression de CD36 avec le traitement à la metformine (figure 3.10). Le CD36 est notamment connu pour son rôle de transporteur d'acides gras (revu par Xu *et al.*, 2013). Les acides gras jouent ensuite différents rôles dans les ostéoblastes, notamment des rôles généraux dans les fonctions de la membrane plasmique mais également des rôles plus spécifiques dans la prolifération et la différenciation cellulaire en modulant des facteurs de transcription comme PPAR γ et runx2 (revu par During *et al.*, 2015). Les gènes runx2 et osx sont d'ailleurs augmentés dans les cellules MC3T3-E1 après l'ajout de metformine (figure 3.15) et les souris CD36 KO ont une expression diminuée de ces deux gènes (Kevorkova *et al.*, 2013). Bien que l'implication de CD36 dans la prolifération cellulaire soit peu caractérisée, des résultats indiquent que la liaison de ligands au récepteur CD36, comme la thrombospondine, augmente la prolifération des cellules

vasculaires en augmentant l'expression de la cycline A (Li et al, 2012), protéine clé de la progression du cycle cellulaire (Desdouets et al, 1995). D'autres membres du laboratoire ont montré que l'ajout de ligands de CD36 dans le milieu de culture de cellules MC3T3-E1 stimule la prolifération cellulaire (Kevorkova et al., soumis). De plus, les souris CD36 KO ont un phénotype osseux altéré et les MSC issues de ces souris ont une survie et une croissance diminuées (Kevorkova et al., 2013). La metformine, contrairement à l'AICAR, pourrait donc avoir des effets positifs sur la balance énergétique et sur la prolifération des cellules MC3T3-E1 via l'augmentation de CD36. L'augmentation de CD36 avec la metformine pourrait également favoriser la captation à partir de lipoprotéines différentes de celles internalisées par le rLDL, dont l'expression est augmentée par le traitement à l'AICAR. En effet, le CD36 a la capacité de lier les HDL (Calvo et al., 1998) qui se sont avérées bénéfiques à la survie des cellules MC3T3-E1 (Brodeur et al., 2008c), alors que le rLDL lie principalement les LDL (revu par Soutar, 1996) qui ont provoqué l'apoptose de ces mêmes cellules (Brodeur et al., 2008b). Des essais de captation des lipoprotéines suite au traitement avec de la metformine et de l'AICAR auraient été pertinents à réaliser dans cette optique. Ces expériences auraient pu confirmer si les modulations de l'expression des récepteurs ont une corrélation avec leur activité de captation. De plus, en lien avec les travaux effectués par Brodeur et ses collègues (2008b) sur la capacité des cellules MC3T3-E1 à internaliser les esters de cholestérol et l'estradiol depuis les HDL et LDL, il aurait été intéressant de comparer l'activité des récepteurs après l'activation de l'AMPK dans les cellules. Nous pouvons en effet supposer que le statut énergétique des cellules influence leurs besoins en nutriments et autres facteurs contenus dans les lipoprotéines et que leur préférence de captation en serait ainsi modifiée.

Une différence observée entre les deux modèles cellulaires est l'augmentation de l'expression de SR-BI par l'AICAR à 2 mM dans les MSC (figure 3.17) mais pas dans les cellules MC3T3-E1 (figure 3.8). Nous avons toutefois émis l'hypothèse que

l'AICAR stabilise la forme protéique de SR-BI dans les cellules MC3T3-E1 considérant que l'expression de l'ARNm de SR-BI est diminuée alors que la forme protéique est inchangée (figure 3.8). De plus, une combinaison de cycloheximide, un inhibiteur traductionnel, et d'AICAR minimise la diminution de la forme protéique de SR-BI par la cycloheximide seule (figure 3.9). L'AICAR pourrait ainsi augmenter la traduction de l'ARNm de SR-BI ou inhiber la dégradation de la protéine. D'autres membres du laboratoire avaient observé que l'expression du SR-BI était plutôt diminuée dans le foie de souris C57Bl/6 traitées à l'AICAR (données non illustrées), il est donc complexe de faire un rapprochement entre les résultats observés dans les différents types cellulaires et modèles expérimentaux. De plus, le rôle du SR-BI dans le métabolisme osseux reste nébuleux puisque celui-ci semble plus ou moins corrélé avec le métabolisme du cholestérol dans les MSC de souris contrairement à son rôle bien connu dans le foie. En effet, la captation d'esters de cholestérol et d'æstrogène n'est pas affectée dans les MSC de souris SR-BI KO (Martineau et al., 2014b), alors que ces mêmes souris voient leur cholestérol plasmatique augmenter de deux fois et développent de l'athérosclérose (revu par Leiva et al., 2011). On peut cependant affirmer que le SR-BI est essentiel au développement normal des os puisque les souris SR-BI KO ont une masse osseuse augmentée (Martineau et al., 2014a) et cela malgré que leurs ostéoblastes ne se différencient pas correctement (Martineau et al., 2014b). Des investigations plus approfondies seraient nécessaires pour mieux comprendre les différences induites par l'AICAR sur le SR-BI dans les différents modèles ostéoblastiques et sur les répercussions de la modulation de ce récepteur sur le métabolisme osseux.

Toujours dans le but d'étudier le métabolisme énergétique des cellules ostéoblastiques, nous avons évalué les effets de l'activation de l'AMPK sur l'activation du complexe mTORC1. Rappelons que ce complexe est, tout comme l'AMPK, un régulateur du métabolisme énergétique très important mais qui active plutôt des voies anaboliques telles que la synthèse de protéines et d'autres macromolécules et la prolifération cellulaire (Inoki et al., 2003). Nous avions émis l'hypothèse que l'activation de l'AMPK par la metformine et l'AICAR pourrait inhiber la prolifération cellulaire en inhibant le complexe mTORC1. De façon étonnante, les traitements avec la metformine et l'AICAR, indépendamment des concentrations utilisées, ont provoqué une activation du complexe mTORC1 telle qu'observée par la phosphorylation de la protéine p70S6K (figure 3.12), cible directe du complexe (Nojima et al., 2003). L'activation du complexe mTORC1 est également confirmée par l'annulation complète de l'effet après l'ajout de rapamycine (figure 3.12), un inhibiteur reconnu de ce complexe (Thoreen et Sabatini, 2009). La rapamycine ne se lie pas directement au complexe mTORC2, il n'est pas donc inhibé par la rapamycine (Jacinto et al., 2004) à court terme (Sarbassov et al., 2006). Il aurait alors été intéressant de vérifier si l'activation de l'AMPK dans notre modèle a un effet sur la protéine TSC2, qui rappelons-le est la voie la mieux caractérisée qu'utilise l'AMPK pour inhiber le complexe mTORC1 (Gwinn et al., 2008). Ces résultats sont étonnants puisque l'activation de l'AMPK est plutôt reconnue pour inhiber le complexe mTORC1 (Gwinn et al., 2008) qui mène à des processus anaboliques tels que la synthèse protéique et la prolifération cellulaire (revu par Zoncu et al., 2011). Nous croyons d'ailleurs que l'augmentation de la prolifération des cellules MC3T3-E1 avec 0,01 mM de metformine et d'AICAR (figure 3.11) pourrait être liée à l'activation du complexe mTORC1 (figure 3.12) conjointement à l'absence de phosphorylation de l'AMPK (figure 3.11). Toutefois, il est de plus en plus observé que la metformine (Foretz et al., 2010; Hardie, 2013; Miller et Birnbaum, 2010) et l'AICAR (Foretz et al., 2010; Hardie, 2013) peuvent influencer des voies de signalisation n'étant pas liées à l'AMPK. La metformine peut par exemple diminuer la prolifération cellulaire en inhibant mTORC1 de façon AMPK indépendante en augmentant la liaison de la protéine RAPTOR avec PRAS40, un inhibiteur du complexe. L'AICAR peut également inhiber le cycle cellulaire en favorisant la dégradation protéasomale de phosphatases impliquées dans le cycle cellulaire (Liu et al, 2014). Ces deux agents ne produisent d'ailleurs pas les mêmes effets métaboliques qu'un activateur direct de l'AMPK, soit le A769622 qui active l'AMPK isolée à partir d'hépatocytes de rat (Cool *et al.*, 2006) alors que la metformine et l'AICAR activent l'AMPK de façon indirecte en modifiant les pools d'AMP/ATP et ADP/ATP dans les cellules (revu par Jeyabalan *et al.*, 2012).

Comme l'AMPK ne semblait pas être la protéine responsable des effets sur le complexe mTORC1, nous avons investigué la voie de l'Akt (figure 3.13), une des principales voies régulant ce complexe (revu par Inoki et al., 2006). Il semble reconnu que la metformine et l'AICAR induisent l'activation de la protéine PDKI (Sajan et al., 2010), qui a son tour active l'Akt puis le complexe mTORC1 (Sarbassov et al., 2005). PDK1 peut également phosphoryler directement la protéine p70S6K (Alessi et al., 1998; Pullen et al., 1998). De plus, l'AICAR semble reconnu pour activer l'Akt dans plusieurs types cellulaires (Sengupta et al., 2007; Tao et al., 2010), ce que nous avons également démontré dans les cellules MC3T3-E1 (figure 3.13). Kanazawa et ses collègues (2009) avaient également montré une augmentation de la phosphorylation d'Akt après un traitement avec 0,5 mM d'AICAR dans les cellules MC3T3-E1. Les études disponibles concernant les effets de la metformine sur l'Akt sont, d'un autre côté, plutôt rares ou semblent indiquer que contrairement à l'AICAR, la metformine aurait un effet inhibiteur sur l'Akt (Ferreira et al., 2014; Zakikhani et al., 2010). Cette différence pourrait expliquer pourquoi l'AICAR induit une activation du complexe mTORC1 plus importante que la metformine dans les cellules MC3T3-E1 (figure 3.13). Un rapprochement pourrait alors être proposé entre la diminution de la synthèse endogène de cholestérol (figure 3.4) et l'activation de l'Akt (figure 3.13) induites par l'AICAR dans les cellules MC3T3-E1, d'autres équipes ayant montré que des inhibiteurs de l'HMGR activent l'Akt dans différents types cellulaires (Kureishi et al., 2000; Qi et al., 2013; Skaletz-Rorowski et al., 2003).

Depuis plusieurs années, il est reconnu que l'Akt augmente l'expression et active SREBP-1 (Fleischmann et Iynedjian, 2000; Porstmann et al., 2008) et SREBP-2 (Du et al., 2006; Luu et al., 2012). Ceci pourrait donc expliquer l'augmentation de l'expression des SREBPs dans les cellules MC3T3-E1 après les traitements à la metformine et l'AICAR (figures 3.5 et 3.6). Dans le cas de l'AICAR, l'activation de SREBP-2 pourrait également s'expliquer par la diminution de cholestérol endogène (Horton et Shimomura, 1999). Il pourrait aussi être supposé que la synthèse d'acides gras via le SREBP-1 soit stimulée suite à l'inhibition de la phosphorylation oxydative engendrée par la metformine, forçant les cellules à utiliser d'autres voies pour la synthèse d'ATP comme la bêta-oxydation ou la glycolyse (Owen et al, 2000). Il est également connu que la metformine (Geerling et al., 2014; Salpeter et al., 2008) et l'AICAR (revu par Viollet et al., 2006) engendrent une diminution des triglycérides, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'expression de SREBP-1. Dans cette optique, il aurait été pertinent de doser les triglycérides dans les cellules après un traitement avec la metformine et l'AICAR. Il aurait aussi été intéressant de distinguer les effets sur les deux isoformes de SREBP-1 (SREBP-1a et SREBP-1c) puisque cellesci ont des rôles différents en plus de différer dans leur distribution cellulaire et tissulaire (revu par Horton et al., 2002). Ceci aurait été d'autant plus pertinent que cette distribution n'est pas connue dans les tissus osseux et que cela aurait permis d'approfondir les connaissances sur le métabolisme énergétique des cellules osseuses. Il se pourrait également que la metformine et l'AICAR n'activent pas au même degré la même isoforme et que ceci explique certaines différences observées dans le métabolisme du cholestérol (figures 3.3 et 3.4) puisque la protéine SREBP-1a active préférentiellement la synthèse du cholestérol alors que la SREBP-1c active plutôt des gènes liés à la synthèse des acides gras (revu par Horton et al., 2002).

Nous avons démontré, tout comme Jang et ses collègues (2011), que la metformine augmente l'expression de runx2 (figure 3.15), un facteur de transcription grandement

impliqué dans la différenciation des MSC en ostéoblastes plutôt qu'en adipocytes (revu par Pino et al., 2012). La metformine à 1 mM augmente également l'expression de deux autres gènes impliqués dans la différenciation ostéoblastique soient osx (Komori, 2006) et collal (Quarles et al., 1992), alors que l'AICAR augmente seulement l'expression du gène col1a1 dans les cellules MC3T3-E1. L'augmentation de ces gènes ne s'est toutefois pas traduite en une augmentation de la différenciation des cellules MC3T3-E1 tant avec la metformine que l'AICAR à forte concentration (figure 3.16). Parallèlement, d'autres équipes avaient démontré que la metformine réduit l'expression de PPARy, un inhibiteur de la différenciation ostéoblastique, dans des MSC de rats (Gao et al., 2008). Le facteur de transcription PPARy étant surtout exprimé sous forme nucléaire (Rosen et Spiegelman, 2001), nous n'avons pas réussi à quantifier la protéine efficacement par immunobuvardage considérant sa faible expression (ces données ne sont pas illustrées). Cette technique aurait pu être peaufinée par l'isolement de la fraction nucléaire. Il aurait été d'autant plus intéressant d'obtenir ce résultat que les effets de la metformine sur PPARy dans les cellules MC3T3-E1 ou autres modèles d'ostéoblastes murins ne sont pas répertoriés à notre connaissance.

Finalement, il était attendu que les fortes concentrations de metformine et d'AICAR diminuent la différenciation des cellules puisque celles-ci induisent la phosphorylation de l'AMPK, qui a son tour inhibe des voies anaboliques. Nous avons observé que la metformine à forte concentration n'a pas d'effet global sur la différenciation alors que l'AICAR entraine la mort des cellules après plus de 7 jours de culture (figure 3.16). La différenciation des cellules étant un processus anabolique, nous ne sommes pas surpris de ces résultats. Le maintien de la phosphorylation de l'AMPK au cours de la différenciation n'a pas été investigué, mais on peut supposer que cette activité chronique cause un épuisement des cellules et possiblement la création de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) lors du blocage de la phosphorylation oxydative (revu Wang *et al.*, 2015) par la metformine. Il avait été observé que les ROS, même à des

concentrations non toxiques, nuisent à la différenciation des cellules MC3T3-E1 non traitées (Arai *et al.*, 2007). L'AICAR à 1 mM avait également causé la mortalité des cellules MC3T3-E1 après plus de 5 jours de culture (Kasai *et al.*, 2009). Dans le même article, Kasai et ses collègues (2009) ont observé que la phosphorylation de la sousunité α de l'AMPK était diminuée durant la différenciation des cellules MC3T3-E1, bien que la forme totale de la protéine ne soit pas modulée. Ceci expliquerait donc pourquoi des concentrations activant l'AMPK auraient des effets néfastes sur la différenciation, comme l'ont d'ailleurs observé d'autres équipes (Jang *et al.*, 2010; Kasai *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2010). D'un autre côté, les faibles concentrations de metformine et d'AICAR ont respectivement favorisé ou n'ont pas eu d'effet sur la différenciation des cellules MC3T3-E1 (figure 3.16) tout comme l'avait déjà observé d'autres équipes (Cortizo *et al.*, 2006; Jang *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2010). Ceci suppose donc que l'activation de l'AMPK a des effets néfastes sur la différenciation des cellules MC3T3-E1 (figure 3.16) tout comme l'avait déjà observé d'autres équipes (Cortizo *et al.*, 2006; Jang *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2010). Ceci suppose donc que l'activation de l'AMPK a des effets néfastes sur la différenciation des cellules des effets néfastes sur la différenciation de l'AMPK a des effets néfastes sur la différenciation des cellules alors que les faibles concentrations de metformine pourraient avoir des effets positifs indépendamment de l'AMPK.

Compte tenu des résultats assez divergents entre les deux activateurs d'AMPK et considérant que les effets positifs des deux composés sur la prolifération, différenciation et migration cellulaire semblent plutôt se produire lorsque l'AMPK n'est pas activée, nous avons voulu inhiber l'expression de l'AMPK pour différencier les effets dépendants et indépendants de cette enzyme. Nous avions observé que plusieurs équipes utilisent la dorsomorphine (*compound c*) pour inhiber l'AMPK dans les cellules osseuses (Lee *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2014). Toutefois, la dorsomorphine n'est pas un bon outil dans les cellules ostéoblastiques puisque ce composé est connu depuis maintenant plusieurs années pour inhiber l'expression de la protéine BMP-2 (Yu *et al.*, 2008), une protéine importante pour la survie des ostéoblastes (Datta *et al.*, 2008). Nous avons donc préféré inhiber l'expression de l'AMPK à l'aide d'un siRNA. Nous n'avons toutefois pas réussi à mettre au point les

conditions expérimentales optimales dans les cellules MC3T3-E1 pour inhiber efficacement l'expression de la protéine sans causer de toxicité cellulaire importante. Il serait donc intéressant de peaufiner la méthode et ainsi pouvoir différencier les effets AMPK dépendants et indépendants de la metformine et de l'AICAR dans les résultats observés. Pour s'assurer de l'activation l'AMPK suite à sa phosphorylation, nous aurions également pu vérifier l'expression et la phosphorylation d'une autre de ces cibles reconnues, soit l'ACC (Munday, 2002; Park *et al.*, 2002). Nous aurions également pu directement mesurer l'activité de l'AMPK par des essais enzymatiques (Lim *et al.*, 2012).

En résumé, nous avons observé que la metformine à faible concentration n'active pas l'AMPK et a des effets positifs sur la prolifération, la migration et la différenciation des cellules MC3T3-E1. La metformine à forte concentration, qui active l'AMPK, ne module pas la synthèse endogène de cholestérol mais provoque l'augmentation de l'expression de CD36, des SREBPs et des gènes ostéoblastiques runx2, osx et col1a1 sans toutefois que cela se traduise en influence positive sur la prolifération, la différenciation et la migration des cellules MC3T3-E1. La metformine à forte concentration augmente légèrement l'expression du rLDL dans les MSC de souris. L'AICAR à faible concentration n'entraine pas l'activation de l'AMPK dans les cellules MC3T3-E1 et augmente leur prolifération mais diminue leur migration sans avoir d'effet sur leur différenciation. Finalement, l'AICAR à forte concentration engendre l'activation de l'AMPK et diminue dramatiquement la prolifération, migration et différenciation des cellules MC3T3-E1 possiblement en corrélation avec une diminution de la synthèse endogène de cholestérol et une augmentation de l'expression du rLDL, malgré la surexpression de SREBP-1 et SREBP-2. De façon étonnante, l'AICAR à 2 mM augmente également l'expression du gène col1a1 dans les cellules MC3T3-E1 et de SR-BI dans les MSC, bien que cette dernière modulation n'ait pas été observée dans les MC3T3-E1. Toutes les conditions de traitement avec la

metformine et l'AICAR active le complexe mTORC1, fort probablement en conséquence à une activation de la voie Akt d'une façon indépendante de l'AMPK.

.

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

D'après les résultats obtenus dans cette étude, les effets de la metformine et de l'AICAR restent encore à préciser dans les cellules osseuses. Il semble que l'activation de l'AMPK, inhibant les processus anaboliques, aurait plutôt des effets négatifs sur la prolifération, la migration ainsi que la différenciation des cellules MC3T3-E1 et que l'induction de ces effets est plus notable avec l'AICAR qu'avec la metformine, possiblement du au différent niveau de phosphorylation de l'AMPK. Ces résultats nous semblent logiques puisqu'ils corroborent les rôles de l'AMPK dans les cellules. Toutefois, des concentrations plus faibles, ressemblant aux concentrations physiologiques de metformine retrouvées dans le sang des patients diabétiques et qui n'activent pas l'AMPK dans notre modèle, pourraient avoir des effets positifs sur les ostéoblastes. Il a également été difficile de faire un rapprochement entre les modulations du métabolisme du cholestérol et les fonctions des ostéoblastes puisque les seuls changements observés sur le cholestérol ont été induits avec l'AICAR à forte concentration, cette même concentration qui nuit à la survie des cellules MC3T3-E1. Ces résultats peuvent toutefois suggérer l'importance du cholestérol dans les fonctions normales des cellules. Il aurait donc été intéressant dans cette étude, de valider les niveaux d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol avec les faibles concentrations de metformine et d'AICAR pour confirmer si les effets obtenus sont maintenus dans les ostéoblastes en absence d'activation de l'AMPK. Par exemple, si l'AICAR à faible concentration induisait les mêmes changements dans le métabolisme du cholestérol, soient la diminution du cholestérol endogène, de l'HMGR et l'augmentation du rLDL, ceux-ci pourraient avoir des effets positifs dans un modèle

in vivo. En effet, la diminution de l'expression de l'HMGR a des effets à la fois positifs sur les ostéoblastes, sensibles aux concentrations de cholestérol, et négatifs sur les ostéoclastes puisque les ostéoclastes n'expriment que très faiblement l'HGMR et cette expression n'est pas augmentée suite à la diminution du cholestérol dans le plasma dans les modèles *in vivo* (Luegmayr *et al.*, 2004). L'usage d'un agent hypolipidémiant pourrait ainsi favoriser les ostéoblastes et la formation osseuse aux dépends des ostéoclastes et de la résorption osseuse. Parallèlement, les résultats obtenus avec la metformine à faible concentration sont rassurants pour les patients diabétiques utilisant ce médicament et ayant les mêmes concentrations plasmatiques. En effet, celle-ci semble avoir des effets positifs sur la prolifération, la migration et la différenciation des ostéoblastes sans trop modifier leur métabolisme lipidique.

Il est évident que l'utilisation d'un modèle *in vivo* serait très pertinente pour la suite de ces travaux. Ceci permettrait de comparer les effets des produits sur les ostéoblastes dans un milieu où ceux-ci sont également influencés par d'autres types cellulaires qui modulent leurs fonctions comme les ostéoclastes et les adipocytes. En plus, les ostéoblastes d'un modèle in vivo seraient fort probablement influencés de façon différente par les produits, considérant que ceux-ci, tel que déjà mentionné, ciblent d'abord le foie. Les effets seraient alors plutôt des conséquences des modulations systémiques plutôt que la stimulation directe des cellules osseuses par les produits. Parallèlement, la création d'un modèle avec une inhibition de l'expression de l'AMPK spécifique au tissu osseux permettrait de supprimer les effets métaboliques indirects de l'AMPK sur les osseuses et de constater son rôle précis sur les cellules osseuses. Il est toutefois ardu de trouver le bon modèle animal pour des travaux à la fois sur le métabolisme osseux et lipidique. En effet, bien que les souris semblent être un bon modèle pour les études sur le métabolisme osseux (Raska et al., 2009), celles-ci n'ont pas le même profil lipoprotéique que les humains et sont plus résistantes au développement de maladies cardiovasculaires (Jawień et al., 2004). Il semble que les

plus grands animaux comme les lapins, porcs et chiens soient de meilleurs modèles pour les maladies cardiovasculaires, mais leur utilisation engendre d'autres problèmes de type financiers, éthiques et pratiques (Jawień *et al.*, 2004). Pour pallier aux différences entre les modèles expérimentaux et aux problèmes engendrés par l'utilisation animale, il serait alors fort intéressant d'étudier l'expression de gènes impliqués dans les deux métabolismes dans les tissus de patients déjà traités avec la metformine pour y noter des corrélations. De plus, il serait intéressant de comparer les patrons d'expression de gènes importants dans les métabolismes osseux et énergétique en fonction du niveau de phosphorylation de l'AMPK et l'activation de certaines de ces cibles directes. Des éclaircissements pourraient alors possiblement apparaitre quant à l'implication de l'AMPK dans ces phénomènes et dans la séquence des évènements cellulaires découlant de l'activation de l'AMPK.

En conclusion, cette étude a permis de révéler que l'activation de l'AMPK a des effets assez divergents dans les cellules MC3T3-E1 et dans les MSC de souris selon le produit et la concentration utilisée. Des conclusions générales sur les conséquences de l'activation de l'AMPK sont alors plutôt difficiles à dresser, d'autant plus que nous n'avons pas pu différencier les effets AMPK dépendants et indépendants de la metformine et de l'AICAR. Nous avons toutefois été les premiers à étudier les modulations de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et le métabolisme du cholestérol dans des cellules ostéoblastiques suite à l'activation de l'AMPK. Ces travaux indiquent également que le cholestérol est impliqué dans les fonctions normales des cellules ostéoblastiques telles que la prolifération, la migration et la différenciation et qu'il pourrait aussi être impliqué dans la différence observée entre les effets de la metformine et de l'AICAR. Nous avons également été les premiers à valider l'expression de diverses protéines dans les cellules MC3T3-E1 et les MSC de souris notamment PCSK9, PDZK1 (NHERF3) et SREBP-1 et SREBP-2, en plus de corréler l'activation de l'AMPK et l'expression du complexe mTORC1 dans un modèle

ostéoblastique. Cette étude ouvre donc la porte à une multitude de nouvelles questions sur le rôle de l'AMPK et du cholestérol dans le métabolisme osseux mais invite également à poursuivre les recherches pour investiguer le métabolisme énergétique des cellules osseuses qui est encore trop peu connu et qui fournirait certainement une foule d'informations cruciales pouvant servir au diagnostic précoce et au traitement de diverses maladies telle l'ostéoporose.

BIBLIOGRAPHIE

Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, 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.

Alessi, D.R., Kozlowski, M.T., Weng, Q.P., Morrice, N., and Avruch, J. (1998). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. Curr. Biol. *8*, 69–81.

Alexander, A., and Walker, C.L. (2011). The role of LKB1 and AMPK in cellular responses to stress and damage. FEBS Lett. 585, 952–957.

Anagnostis, P., Karagiannis, A., Kakafika, A.I., Tziomalos, K., Athyros, V.G., and Mikhailidis, D.P. (2009). Atherosclerosis and osteoporosis: age-dependent degenerative processes or related entities? Osteoporos. Int. J. 20, 197–207.

Arai, M., Shibata, Y., Pugdee, K., Abiko, Y., and Ogata, Y. (2007). Effects of reactive oxygen species (ROS) on antioxidant system and osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. IUBMB Life *59*, 27–33.

Bastie, C.C., Nahlé, Z., McLoughlin, T., Esser, K., Zhang, W., Unterman, T., and Abumrad, N.A. (2005). FoxO1 stimulates fatty acid uptake and oxidation in muscle cells through CD36-dependent and -independent mechanisms. J. Biol. Chem. 280, 14222–14229.

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

Beg, Z.H., Stonik, J.A., and Brewer, H.B. (1978). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: regulation of enzymatic activity by phosphorylation and dephosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 3678–3682.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. (2002). The complex regulation of cholesterol biosynthesis takes place at several levels. Biochemistry. 5th edition. Section 26.3.

Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., and Rodan, G.A. (2002). Preface to the second edition. In principles of bone biology (Second Edition), J.P.B.G.R.A. Rodan, ed. (San Diego: Academic Press), p. xxi.

Bochem, A.E., Holleboom, A.G., Romijn, J.A., Hoekstra, M., Dallinga-Thie, G.M., Motazacker, M.M., Hovingh, G.K., Kuivenhoven, J.A., and Stroes, E.S.G. (2013). High density lipoprotein as a source of cholesterol for adrenal steroidogenesis: a study in individuals with low plasma HDL-C. J. Lipid Res. *54*, 1698–1704.

Brautbar, A., and Ballantyne, C.M. (2011). Pharmacological strategies for lowering LDL cholesterol: statins and beyond. Nat. Rev. Cardiol. *8*, 253–265.

Brodeur, M.R., Brissette, L., Falstrault, L., Ouellet, P., and Moreau, R. (2008a). Influence of oxidized low-density lipoproteins (LDL) on the viability of osteoblastic cells. Free Radic. Biol. Med. 44, 506–517.

Brodeur, M.R., Brissette, L., Falstrault, L., Luangrath, V., and Moreau, R. (2008b). Scavenger receptor of class B expressed by osteoblastic cells are implicated in the uptake of cholesteryl ester and estradiol from LDL and HDL3. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. *23*, 326–337.

Brodeur, M.R., Brissette, L., Falstrault, L., and Moreau, R. (2008c). HDL3 reduces the association and modulates the metabolism of oxidized LDL by osteoblastic cells: a protection against cell death. J. Cell. Biochem. *105*, 1374–1385.

Brown, M.S., Anderson, R.G.W., and Goldstein, J.L. (1983). Recycling receptors: The round-trip itinerary of migrant membrane proteins. Cell *32*, 663–667.

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.

Calvo, D., Gómez-Coronado, D., Suárez, Y., Lasunción, M.A., and Vega, M.A. (1998). Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. J. Lipid Res. *39*, 777–788.

Cao, G., Garcia, C.K., Wyne, K.L., Schultz, R.A., Parker, K.L., and Hobbs, H.H. (1997). Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. J. Biol. Chem. 272, 33068–33076.

Cantó, C., and Auwerx, J. (2010). AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. Cell. Mol. Life Sci. *67*, 3407–3423.

Carling, D., Sanders, M.J., and Woods, A. (2008). The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. Int. J. Obes. *32 Suppl 4*, S55–S59.

Carlson, C.A., and Kim, K.H. (1973). Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. J. Biol. Chem. 248, 378–380.

Cheung, P.C., Salt, I.P., Davies, S.P., Hardie, D.G., and Carling, D. (2000). Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. Biochem. J. *346*, 659–669.

Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. *3 Suppl 3*, S131–S139.

Clarke, P.R., and Hardie, D.G. (1990). Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. EMBO J. 9, 2439–2446.

Collins, R.F., Touret, N., Kuwata, H., Tandon, N.N., Grinstein, S., and Trimble, W.S. (2009). Uptake of oxidized low density lipoprotein by CD36 occurs by an actindependent pathway distinct from macropinocytosis. J. Biol. Chem. *284*, 30288–30297.

Cool, B., Zinker, B., Chiou, W., Kifle, L., Cao, N., Perham, M., Dickinson, R., Adler, A., Gagne, G., Iyengar, R., et al. (2006). Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. Cell Metab. *3*, 403–416.

Cortizo, A.M., Sedlinsky, C., McCarthy, A.D., Blanco, A., and Schurman, L. (2006). Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. Eur. J. Pharmacol. *536*, 38–46.

Corton, J.M., Gillespie, J.G., and Hardie, D.G. (1994). Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. Curr. Biol. 4, 315–324.

Datta, H.K., Ng, W.F., Walker, J.A., Tuck, S.P., and Varanasi, S.S. (2008). The cell biology of bone metabolism. J. Clin. Pathol. *61*, 577–587.

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.

Davis, C.G., van Driel, I.R., Russell, D.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1987). The low density lipoprotein receptor. Identification of amino acids in cytoplasmic domain required for rapid endocytosis. J. Biol. Chem. *262*, 4075–4082.

Defesche, J.C. (2004). Low-density lipoprotein receptor--its structure, function, and mutations. Semin. Vasc. Med. 4, 5–11.

Desdouets, C., Sobczak-Thépot, J., Murphy, M., and Bréchot, C. (1995). Cyclin A: function and expression during cell proliferation. Prog. Cell Cycle Res. 1, 115–123.

Dessì, S., Batetta, B., Chiodino, C., and Pani, P. (1988). A mechanistic association between cholesterol metabolism and cell proliferation. In Chemical Carcinogenesis, F. Feo, P. Pani, A. Columbano, and R. Garcea, eds. (Springer US), pp. 505–517.

DiNicolantonio, J.J., Bhutani, J., and O'Keefe, J.H. (2015). The health benefits of vitamin K. Open Heart 2, e000300.

van Driel, M., and van Leeuwen, J.P.T.M. (2014). Vitamin D endocrine system and osteoblasts. BoneKEy Rep 3.

Du, X., Kristiana, I., Wong, J., and Brown, A.J. (2006). Involvement of Akt in ER-to-Golgi transport of SCAP/SREBP: a link between a key cell proliferative pathway and membrane synthesis. Mol. Biol. Cell *17*, 2735–2745.

During, A., Penel, G., and Hardouin, P. (2015). Understanding the local actions of lipids in bone physiology. Prog. Lipid Res. 59, 126–146.

ElAzzouny, M.A., Evans, C.R., Burant, C.F., and Kennedy, R.T. (2015). Metabolomics analysis reveals that AICAR affects glycerolipid, ceramide and nucleotide synthesis pathways in INS-1 cells. PLoS ONE *10*, e0129029.

Feresin, R.G., Johnson, S.A., Elam, M.L., Kim, J.-S., Khalil, D.A., Lucas, E.A., Smith, B.J., Payton, M.E., Akhter, M.P., and Arjmandi, B.H. (2013). Effects of vitamin E on bone biomechanical and histomorphometric parameters in ovariectomized rats. J. Osteoporos. 2013, 1–9.

Ferreira, G.D., Germeyer, A., de Barros Machado, A., do Nascimento, T.L., Strowitzki, T., Brum, I.S., von Eye Corleta, H., and Capp, E. (2014). Metformin modulates PI3K and GLUT4 expression and Akt/PKB phosphorylation in human endometrial stromal cells after stimulation with androgen and insulin. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. *175*, 157–162.

Fleischmann, M., and Iynedjian, P.B. (2000). Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt. Biochem. J. *349*, 13–17.

Fong, J.E., Le Nihouannen, D., Tiedemann, K., Sadvakassova, G., Barralet, J.E., and Komarova, S.V. (2013). Moderate excess of pyruvate augments osteoclastogenesis. Biol. Open *2*, 387–395.
Foretz, M., Taleux, N., Guigas, B., Horman, S., Beauloye, C., Andreelli, F., Bertrand, B., Viollet, B. (2006). Régulation du métabolisme énergétique par l'AMPK. Une nouvelle voie thérapeutique pour le traitement des maladies métaboliques et cardiaques. Med. Sci. 381-388.

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.

Fujita, K., Iwasaki, M., Ochi, H., Fukuda, T., Ma, C., Miyamoto, T., Takitani, K., Negishi-Koga, T., Sunamura, S., Kodama, T., et al. (2012). Vitamin E decreases bone mass by stimulating osteoclast fusion. Nat. Med. *18*, 589–594.

Gao, W., Li, J.Z.H., Chan, J.Y.W., Ho, W.K., and Wong, T.-S. (2012). mTOR pathway and mTOR inhibitors in head and neck cancer. ISRN Otolaryngol. 2012, 953089.

Gao, Y., Xue, J., Li, X., Jia, Y., and Hu, J. (2008). Metformin regulates osteoblast and adipocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells. J. Pharm. Pharmacol. *60*, 1695–1700.

Geerling, J.J., Boon, M.R., van der Zon, G.C., van den Berg, S.A.A., van den Hoek, A.M., Lombès, M., Princen, H.M.G., Havekes, L.M., Rensen, P.C.N., and Guigas, B. (2014). Metformin lowers plasma triglycerides by promoting VLDL-triglyceride clearance by brown adipose tissue in mice. Diabetes *63*, 880–891.

Gibon, E., Batke, B., Jawad, M.U., Fritton, K., Rao, A., Yao, Z., Biswal, S., Gambhir, S.S., and Goodman, S.B. (2012). MC3T3-E1 osteoprogenitor cells systemically migrate to a bone defect and enhance bone healing. Tissue Eng. Part A *18*, 968–973.

Gingras, A.C., Raught, B., Gygi, S.P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S.K., Polakiewicz, R.D., Wyslouch-Cieszynska, A., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (2001). Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. Genes Dev. *15*, 2852–2864.

Goldberg, I.J., Eckel, R.H., and Abumrad, N.A. (2009). Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. J. Lipid Res. *50 Suppl*, S86–S90.

Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. Nature 343, 425–430.

Greenwalt, D.E., Scheck, S.H., and Rhinehart-Jones, T. (1995). Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet. J. Clin. Invest. *96*, 1382–1388.

Gimeno-Alcañiz, J.V., and Sanz, P. (2003). Glucose and type 2A protein phosphatase regulate the interaction between catalytic and regulatory subunits of AMP-activated protein kinase. J. Mol. Biol. *333*, 201–209.

Guigas, B., Taleux, N., Foretz, M., Detaille, D., Andreelli, F., Viollet, B., and Hue, L. (2007). AMP-activated protein kinase-independent inhibition of hepatic mitochondrial oxidative phosphorylation by AICA riboside. Biochem. J. *404*, 499–507.

Gunton, J.E., Delhanty, P.J.D., Takahashi, S.-I., and Baxter, R.C. (2003). Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. J. Clin. Endocrinol. Metab. *88*, 1323–1332.

Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of Raptor mediates a metabolic checkpoint. Mol. Cell *30*, 214–226.

Hadjidakis, D.J., and Androulakis, I.I. (2006). Bone remodeling. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1092, 385–396.

Hamelin, B.A., and Turgeon, J. (1998). Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. Trends Pharmacol. Sci. 19, 26–37.

Hamerman, D. (2005). Osteoporosis and atherosclerosis: biological linkages and the emergence of dual-purpose therapies. QJM Mon. *98*, 467–484.

Hampton, R.Y., Gardner, R.G., and Rine, J. (1996). Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. Mol. Biol. Cell 7, 2029–2044.

Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. Cell *110*, 177–189.

Harada, M., Nattel, S.N., and Nattel, S. (2012). AMP-activated protein kinase: potential role in cardiac electrophysiology and arrhythmias. Circ. Arrhythm. Electrophysiol. *5*, 860–867.

Hardie, D.G. (2008). AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. Int. J. Obes. *32*, S7–S12.

Hardie, D.G. (2013). AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. Diabetes *62*, 2164–2172.

Hardie, D.G., and Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? Eur. J. Biochem. 246, 259–273.

Hardie, D.G., and Hawley, S.A. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. 23, 1112–1119.

Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 13, 251–262.

Hawley, S.A., Pan, D.A., Mustard, K.J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A.M., Frenguelli, B.G., and Hardie, D.G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. Cell Metab. *2*, 9–19.

Haÿ, E., Laplantine, E., Geoffroy, V., Frain, M., Kohler, T., Müller, R., and Marie, P.J. (2009). N-cadherin interacts with axin and LRP5 to negatively regulate Wnt/β -catenin signaling, osteoblast function, and bone formation. Mol. Cell. Biol. 29, 953–964.

He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu. Rev. Genet. 43, 67–93.

Helisten, H., Höckerstedt, A., Wähälä, K., Tiitinen, A., Adlercreutz, H., Jauhiainen, M., and Tikkanen, M.J. (2001). Accumulation of high-density lipoprotein-derived estradiol- 17β fatty acid esters in low-density lipoprotein particles. J. Clin. Endocrinol. Metab. *86*, 1294–1300.

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.

Herrero-Martín, G., Høyer-Hansen, M., García-García, C., Fumarola, C., Farkas, T., López-Rivas, A., and Jäättelä, M. (2009). TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. EMBO J. *28*, 677–685.

Horton, J.D., and Shimomura, I. (1999). Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. Curr. Opin. Lipidol. 10, 143–150.

Horton, M.A., Nesbitt, S.A., Bennett, J.H., and Stenbeck, G. (2002). Chapter 17 - Integrins and other cell surface attachment molecules of bone cells. In Principles of Bone Biology (Second Edition), J.P.B.G.R.A. Rodan, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 265 – XX.

Hresko, R.C., and Mueckler, M. (2005). mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. J. Biol. Chem. 280, 40406–40416.

Hurtado, V., Roncero, I., Blazquez, E., Alvarez, E., and Sanz, C. (2013). Glucagonlike peptide-1 and its implications in obesity. In hot topics in endocrine and endocrinerelated diseases, M. Fedele, ed. (InTech).

Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. Cell *115*, 577–590.

Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüegg, M.A., Hall, A., and Hall, M.N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. Nat. Cell Biol. *6*, 1122–1128.

Jairam, V., Uchida, K., and Narayanaswami, V. (2012). Pathophysiology of lipoprotein oxidation. In lipoproteins - role in health and diseases, G. Kostner, ed. (InTech).

Jawień, J., Nastałek, P., and Korbut, R. (2004). Mouse models of experimental atherosclerosis. J. Physiol. Pharmacol. 55, 503–517.

Jefferies, H.B., Fumagalli, S., Dennis, P.B., Reinhard, C., Pearson, R.B., and Thomas, G. (1997). Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. EMBO J. *16*, 3693–3704.

Jeyabalan, J., Shah, M., Viollet, B., and Chenu, C. (2012). AMP-activated protein kinase pathway and bone metabolism. J. Endocrinol. *212*, 277–290.

Jeyabalan, J., Viollet, B., Smitham, P., Ellis, S.A., Zaman, G., Bardin, C., Goodship, A., Roux, J.P., Pierre, M., and Chenu, C. (2013). The anti-diabetic drug metformin does not affect bone mass in vivo or fracture healing. Osteoporos. Int. *24*, 2659–2670.

Jha, B. (2014). Adenosine monophosphate activated kinase (AMPK) the breakthrough target for metabolic syndrome. Sch. J. App. Med. Sci., *2*, 911-916

Jørgensen, S.B., Viollet, B., Andreelli, F., Frøsig, C., Birk, J.B., Schjerling, P., Vaulont, S., Richter, E.A., and Wojtaszewski, J.F.P. (2004). Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranosidebut not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. J. Biol. Chem. 279, 1070–1079.

Kanazawa, I., Yamaguchi, T., Yano, S., Yamauchi, M., and Sugimoto, T. (2009). Activation of AMP kinase and inhibition of Rho kinase induce the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through endothelial NOS and BMP-2 expression. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *296*, E139–E146.

Kanellis, J., Kandane, R.K., Etemadmoghadam, D., Fraser, S.A., Mount, P.F., Levidiotis, V., Kemp, B.E., and Power, D.A. (2006). Activators of the energy sensing kinase AMPK inhibit random cell movement and chemotaxis in U937 cells. Immunol. Cell Biol. *84*, 6–12.

Kang, H., Viollet, B., and Wu, D. (2013). Genetic deletion of catalytic subunits of AMP-activated protein kinase increases osteoclasts and reduces bone mass in young adult mice. J. Biol. Chem. 288, 12187–12196.

Kasai, T., Bandow, K., Suzuki, H., Chiba, N., Kakimoto, K., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Nagaoka, E., and Matsuguchi, T. (2009). Osteoblast differentiation is functionally associated with decreased AMP kinase activity. J. Cell. Physiol. *221*, 740–749.

Kassi, E., Adamopoulos, C., Basdra, E.K., and Papavassiliou, A.G. (2013). Role of Vitamin D in Atherosclerosis. Circulation *128*, 2517–2531.

Kayal, R.A., Tsatsas, D., Bauer, M.A., Allen, B., Al-Sebaei, M.O., Kakar, S., Leone, C.W., Morgan, E.F., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., et al. (2007). Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity. J. Bone Miner. Res. *22*, 560–568.

Kayden, H.J., and Traber, M.G. (1993). Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. J. Lipid Res. *34*, 343–358.

Kevorkova, O., Martineau, C., Martin-Falstrault, L., Sanchez-Dardon, J., Brissette, L., and Moreau, R. (2013). Low-bone-mass phenotype of deficient mice for the cluster of differentiation 36 (CD36). PLoS ONE *8*, e77701.

Khazai, N.B., Beck, G.R., and Umpierrez, G.E. (2009). Diabetes and fractures: an overshadowed association. Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. *16*, 435–445.

Khoo, B. (2015). Genetic therapies to lower cholesterol. Vascul. Pharmacol. 64, 11–15.

Kim, J.-E., Ahn, M.-W., Baek, S.-H., Lee, I.K., Kim, Y.-W., Kim, J.-Y., Dan, J.-M., and Park, S.-Y. (2008). AMPK activator, AICAR, inhibits palmitate-induced apoptosis in osteoblast. Bone *43*, 394–404.

Klein, B.Y., Rojansky, N., Ben-Yehuda, A., Abou-Atta, I., Abedat, S., and Friedman, G. (2003). Cell death in cultured human Saos2 osteoblasts exposed to low-density lipoprotein. J. Cell. Biochem. *90*, 42–58.

Kodiha, M., Rassi, J.G., Brown, C.M., and Stochaj, U. (2007). Localization of AMP kinase is regulated by stress, cell density, and signaling through the MEK-->ERK1/2 pathway. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *293*, C1427–C1436.

Kohli, S.S., and Kohli, V.S. (2011). Role of RANKL–RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. Indian J. Endocrinol. Metab. *15*, 175–181.

Komori, T. (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. J. Cell. Biochem. *99*, 1233–1239.

Krassas, G.E., and Papadopoulou, P. (2001). Oestrogen action on bone cells. J. Musculoskelet. Neuronal Interact. 2, 143–151.

Krieger, M., and Kozarsky, K. (1999). Influence of the HDL receptor SR-BI on atherosclerosis. Curr. Opin. Lipidol. 10, 491–497.

Kureishi, Y., Luo, Z., Shiojima, I., Bialik, A., Fulton, D., Lefer, D.J., Sessa, W.C., and Walsh, K. (2000). The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. Nat. Med. *6*, 1004–1010.

Lagace, T.A., Curtis, D.E., Garuti, R., McNutt, M.C., Park, S.W., Prather, H.B., Anderson, N.N., Ho, Y.K., Hammer, R.E., and Horton, J.D. (2006). Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. J. Clin. Invest. *116*, 2995–3005.

Lambert, G., Charlton, F., Rye, K.-A., and Piper, D.E. (2009). Molecular basis of PCSK9 function. Atherosclerosis 203, 1–7.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. Cell 149, 274–293.

Leclerc, I., Kahn, A., and Doiron, B. (1998). The 5'-AMP-activated protein kinase inhibits the transcriptional stimulation by glucose in liver cells, acting through the glucose response complex. FEBS Lett. 431, 180–184.

Lee, Y.-S., Kim, Y.-S., Lee, S.-Y., Kim, G.-H., Kim, B.-J., Lee, S.-H., Lee, K.-U., Kim, G.-S., Kim, S.-W., and Koh, J.-M. (2010). AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts. Bone *47*, 926–937.

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, W., Klenotic P.A., Silverstein, R. (2012). Thrombospondin 1/cd36 signaling promotes vascular smooth muscle cell proliferation and contributes to neointimal hyperplasia. Vascular Disease: Biology and Clinical Science. 126: A16993.

Liang, J., Shao, S.H., Xu, Z.-X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D.J., Gutterman, J.U., Walker, C.L., et al. (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. Nat. Cell Biol. *9*, 218–224.

Lim, C.T., Lolli, F., Thomas, J.D., Kola, B., and Korbonits, M. (2012). Measurement of AMP-activated protein kinase activity and expression in response to ghrelin. Methods Enzymol. *514*, 271–287.

Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., and Zhao, J.J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. Nat. Rev. Drug Discov. *8*, 627–644.

Liu, X., Chhipa, R.R., Pooya, S., Wortman, M., Yachyshin, S., Chow, L.M.L., Kumar, A., Zhou, X., Sun, Y., Quinn, B., et al. (2014). Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, E435-444.

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.

Luegmayr, E., Glantschnig, H., Wesolowski, G.A., Gentile, M.A., Fisher, J.E., Rodan, G.A., and Reszka, A.A. (2004). Osteoclast formation, survival and morphology are highly dependent on exogenous cholesterol/lipoproteins. Cell Death Differ. *11 Suppl 1*, S108–S118.

Luu, W., Sharpe, L.J., Stevenson, J., and Brown, A.J. (2012). Akt acutely activates the cholesterogenic transcription factor SREBP-2. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. *1823*, 458–464.

Ma, L., Wu, X., Ling-Ling, E., Wang, D.-S., and Liu, H.-C. (2009). The transmembrane transport of metformin by osteoblasts from rat mandible. Arch. Oral Biol. *54*, 951–962.

Maeda, T., Matsunuma, A., Kurahashi, I., Yanagawa, T., Yoshida, H., and Horiuchi, N. (2004). Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. J. Cell. Biochem. *92*, 458–471.

Majima, T., Shimatsu, A., Komatsu, Y., Satoh, N., Fukao, A., Ninomiya, K., Matsumura, T., and Nakao, K. (2008). Increased bone turnover in patients with hypercholesterolemia. Endocr. J. 55, 143–151.

Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., et al. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. Cell Metab. *6*, 458–471.

Martineau, C., Martin-Falstrault, L., Brissette, L., and Moreau, R. (2014a). The atherogenic Scarb1 null mouse model shows a high bone mass phenotype. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *306*, E48–E57.

Martineau, C., Kevorkova, O., Brissette, L., and Moreau, R. (2014b). Scavenger receptor class B, type I (Scarb1) deficiency promotes osteoblastogenesis but stunts terminal osteocyte differentiation. Physiol. Rep. 2. E12-17.

McCarty, M.F. (2014). AMPK activation--protean potential for boosting healthspan. Age Dordr. Neth. *36*, 641–663.

Mead, J.R., Irvine, S.A., and Ramji, D.P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. J. Mol. Med. Berl. Ger. *80*, 753–769.

Meaney, S. (2014). Epigenetic regulation of cholesterol homeostasis. Front. Genet. 5, 311.

Miller, R.A., and Birnbaum, M.J. (2010). An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin. J. Clin. Invest. 120, 2267–2270.

Mody, N., Parhami, F., Sarafian, T.A., and Demer, L.L. (2001). Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. Free Radic. Biol. Med. *31*, 509–519.

Munday, M.R. (2002). Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. Biochem. Soc. Trans. *30*, 1059–1064.

Nakamura, T., Shibata, N., Nishimoto-Shibata, T., Feng, D., Ikemoto, M., Motojima, K., Iso-O, N., Tsukamoto, K., Tsujimoto, M., and Arai, H. (2005). Regulation of SR-BI protein levels by phosphorylation of its associated protein, PDZK1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 13404–13409.

Nathan, D.M., Buse, J.B., Davidson, M.B., Ferrannini, E., Holman, R.R., Sherwin, R., Zinman, B., American Diabetes Association, and European Association for Study of Diabetes (2009). Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. Diabetes Care *32*, 193–203.

Newman, P., Bonello, F., Wierzbicki, A.S., Lumb, P., Savidge, G.F., and Shearer, M.J. (2002). The uptake of lipoprotein-borne phylloquinone (vitamin K1) by osteoblasts and osteoblast-like cells: role of heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. J. Bone Miner. Res. *17*, 426–433.

Nicholson, A.C. (2004). Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPARgamma signaling. Trends Cardiovasc. Med. *14*, 8–12.

Niemeier, A., Kassem, M., Toedter, K., Wendt, D., Ruether, W., Beisiegel, U., and Heeren, J. (2005). Expression of LRP1 by human osteoblasts: a mechanism for the delivery of lipoproteins and vitamin K1 to bone. J. Bone Miner. Res. 20, 283–293.

Niemeier, A., Niedzielska, D., Secer, R., Schilling, A., Merkel, M., Enrich, C., Rensen, P.C.N., and Heeren, J. (2008). Uptake of postprandial lipoproteins into bone in vivo: impact on osteoblast function. Bone *43*, 230–237.

Nohturfft, A., Yabe, D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Espenshade, P.J. (2000). Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. Cell *102*, 315–323.

Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2003). The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. J. Biol. Chem. *278*, 15461–15464.

Okayasu, M., Nakayachi, M., Hayashida, C., Ito, J., Kaneda, T., Masuhara, M., Suda, N., Sato, T., and Hakeda, Y. (2012). Low-density lipoprotein receptor deficiency causes impaired osteoclastogenesis and increased bone mass in mice because of defect in osteoclastic cell-cell fusion. J. Biol. Chem. 287, 19229–19241.

Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J., and Seed, B. (1989). CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. Cell *58*, 95–101.

Orozco, P. (2004). Atherogenic lipid profile and elevated lipoprotein (a) are associated with lower bone mineral density in early postmenopausal overweight women. Eur. J. Epidemiol. *19*, 1105–1112.

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. Biochem. J. 348, 607–614.

Pang, T., Zhang, Z.-S., Gu, M., Qiu, B.-Y., Yu, L.-F., Cao, P.-R., Shao, W., Su, M.-B., Li, J.-Y., Nan, F.-J., et al. (2008). Small molecule antagonizes autoinhibition and activates AMP-activated protein kinase in cells. J. Biol. Chem. *283*, 16051–16060.

Parhami, F., Morrow, A.D., Balucan, J., Leitinger, N., Watson, A.D., Tintut, Y., Berliner, J.A., and Demer, L.L. (1997). Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *17*, 680–687.

Parhami, F., Jackson, S.M., Tintut, Y., Le, V., Balucan, J.P., Territo, M., and Demer, L.L. (1999). Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. J. Bone Miner. Res. *14*, 2067–2078.

Parhami, F., Garfinkel, A., and Demer, L.L. (2000). Role of lipids in osteoporosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20, 2346–2348.

Parhami, F., Mody, N., Gharavi, N., Ballard, A.J., Tintut, Y., and Demer, L.L. (2002). Role of the cholesterol biosynthetic pathway in osteoblastic differentiation of marrow stromal cells. J. Bone Miner. Res. *17*, 1997–2003.

Park, S.H., Gammon, S.R., Knippers, J.D., Paulsen, S.R., Rubink, D.S., and Winder, W.W. (2002). Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 *92*, 2475–2482.

Park, S.W., Moon, Y.-A., and Horton, J.D. (2004). Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. J. Biol. Chem. 279, 50630–50638.

Pelton, K., Krieder, J., Joiner, D., Freeman, M.R., Goldstein, S.A., and Solomon, K.R. (2012). Hypercholesterolemia promotes an osteoporotic phenotype. Am. J. Pathol. *181*, 928–936.

Pino, A.M., Rosen, C.J., and Rodríguez, J.P. (2012). In Osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis. Biol. Res. 45, 279–287.

Polekhina, G., Gupta, A., Michell, B.J., van Denderen, B., Murthy, S., Feil, S.C., Jennings, I.G., Campbell, D.J., Witters, L.A., Parker, M.W., et al. (2003). AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. Curr. Biol. *13*, 867–871.

Porstmann, T., Santos, C.R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leevers, S., Griffiths, J.R., Chung, Y.-L., and Schulze, A. (2008). SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. Cell Metab. *8*, 224–236.

Pullen, N., Dennis, P.B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S.C., Hemmings, B.A., and Thomas, G. (1998). Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. Science *279*, 707–710.

Qi, X.-F., Zheng, L., Lee, K.-J., Kim, D.-H., Kim, C.-S., Cai, D.-Q., Wu, Z., Qin, J.-W., Yu, Y.-H., and Kim, S.-K. (2013). HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis of lymphoma cells by promoting ROS generation and regulating Akt, Erk and p38 signals via suppression of mevalonate pathway. Cell Death Dis. *4*, e518.

Qian, Y.-W., Schmidt, R.J., Zhang, Y., Chu, S., Lin, A., Wang, H., Wang, X., Beyer, T.P., Bensch, W.R., Li, W., et al. (2007). Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. J. Lipid Res. *48*, 1488–1498.

Quarles, L.D., Yohay, D.A., Lever, L.W., Caton, R., and Wenstrup, R.J. (1992). Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. J. Bone Miner. Res. *7*, 683–692.

Quinn, J.M.W., Tam, S., Sims, N.A., Saleh, H., McGregor, N.E., Poulton, I.J., Scott, J.W., Gillespie, M.T., Kemp, B.E., and van Denderen, B.J.W. (2010). Germline deletion of AMP-activated protein kinase beta subunits reduces bone mass without altering osteoclast differentiation or function. FASEB J. 24, 275–285.

Ramprasad, O.G., Srinivas, G., Rao, K.S., Joshi, P., Thiery, J.P., Dufour, S., and Pande, G. (2007). Changes in cholesterol levels in the plasma membrane modulate cell signaling and regulate cell adhesion and migration on fibronectin. Cell Motil. Cytoskeleton *64*, 199–216.

Rao, K.N. (1995). The significance of the cholesterol biosynthetic pathway in cell growth and carcinogenesis (review). Anticancer Res. *15*, 309–314.

Raska, O., Bernásková, K., and Raska, I. (2009). Bone metabolism: a note on the significance of mouse models. Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov. *58*, 459–471.

Rena, G., Pearson, E.R., and Sakamoto, K. (2013). Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? Diabetologia *56*, 1898–1906.

Rhainds, D., and Brissette, L. (2004). The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. Defining the rules for lipid traders. Int. J. Biochem. Cell Biol. *36*, 39–77.

Riggs, B.L. (2000). The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. J. Clin. Invest. *106*, 1203–1204.

Rigotti, A., Miettinen, H.E., 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.

Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2001). PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. J. Biol. Chem. 276, 37731–37734.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. N. Engl. J. Med. 340, 115–126.

Russell, D.W. (1992). Cholesterol biosynthesis and metabolism. Cardiovasc. Drugs Ther. 6, 103–110.

Rye, K.-A., and Barter, P.J. (2014). Regulation of high-density lipoprotein metabolism. Circ. Res. *114*, 143–156.

Sajan, M.P., Bandyopadhyay, G., Miura, A., Standaert, M.L., Nimal, S., Longnus, S.L., Van Obberghen, E., Hainault, I., Foufelle, F., Kahn, R., et al. (2010). AICAR and metformin, but not exercise, increase muscle glucose transport through AMPK-, ERK-, and PDK1-dependent activation of atypical PKC. Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. *298*, E179–E192.

Saland, J.M., and Ginsberg, H.N. (2007). Lipoprotein metabolism in chronic renal insufficiency. Pediatr. Nephrol. Berl. Ger. 22, 1095–1112.

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.e2.

Salt, I., Celler, J.W., Hawley, S.A., Prescott, A., Woods, A., Carling, D., and Hardie, D.G. (1998). AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. Biochem. J. *334*, 177–187.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.-H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. Curr. Biol. *14*, 1296–1302.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science *307*, 1098–1101.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. Mol. Cell 22, 159–168.

Sato, R., and Takano, T. (1995). Regulation of intracellular cholesterol metabolism. Cell Struct. Funct. 20, 421–427.

Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., and Liu, J.O. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. Nat. Chem. Biol. *6*, 209–217.

Scott, L.M., and Tomkin, G.H. (1983). Changes in hepatic and intestinal cholesterol regulatory enzymes: The influence of metformin. Biochem. Pharmacol. *32*, 827–830.

Sengupta, T.K., Leclerc, G.M., Hsieh-Kinser, T.T., Leclerc, G.J., Singh, I., and Barredo, J.C. (2007). Cytotoxic effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR) on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells: implication for targeted therapy. Mol. Cancer *6*, 46.

Shah, M., Kola, B., Bataveljic, A., Arnett, T.R., Viollet, B., Saxon, L., Korbonits, M., and Chenu, C. (2010). AMP-activated protein kinase (AMPK) activation regulates in vitro bone formation and bone mass. Bone *47*, 309–319.

Shen, W.-J., Hu, J., Hu, Z., Kraemer, F.B., and Azhar, S. (2014). Scavenger receptor class B type I (SR-BI): a versatile receptor with multiple functions and actions. Metabolism *63*, 875–886.

Shu, Y., Sheardown, S.A., Brown, C., Owen, R.P., Zhang, S., Castro, R.A., Ianculescu, A.G., Yue, L., Lo, J.C., Burchard, E.G., et al. (2007). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. J. Clin. Invest. *117*, 1422–1431.

Sims, N.A., and Martin, T. John (2014). Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. BoneKEy Rep *3*.

Singh, P., Saxena, R., Srinivas, G., Pande, G., and Chattopadhyay, A. (2013). Cholesterol biosynthesis and homeostasis in regulation of the cell cycle. PloS One *8*, e58833.

Skaletz-Rorowski, A., Lutchman, M., Kureishi, Y., Lefer, D.J., Faust, J.R., and Walsh, K. (2003). HMG-CoA reductase inhibitors promote cholesterol-dependent Akt/PKB translocation to membrane domains in endothelial cells. Cardiovasc. Res. *57*, 253–264.

Soutar, A.K. (1996). Intracellular transport of the low-density lipoprotein receptor. Biochem. Soc. Trans. 24, 547–552.

Speeckaert, M.M., Taes, Y.E., De Buyzere, M.L., Christophe, A.B., Kaufman, J.-M., and Delanghe, J.R. (2010). Investigation of the potential association of vitamin D binding protein with lipoproteins. Ann. Clin. Biochem. 47, 143–150.

Srivastava, R.A.K., Pinkosky, S.L., Filippov, S., Hanselman, J.C., Cramer, C.T., and Newton, R.S. (2012). AMP-activated protein kinase: an emerging drug target to regulate imbalances in lipid and carbohydrate metabolism to treat cardio-metabolic diseases: Thematic Review Series: New Lipid and Lipoprotein Targets for the Treatment of Cardiometabolic Diseases. J. Lipid Res. *53*, 2490–2514.

Steinberg, D. (1997). Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. J. Biol. Chem. 272, 20963–20966.

Südhof, T.C., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Russell, D.W. (1985). The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. Science 228, 815–822.

Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T., and Neumann, D. (2006). Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. J. Biol. Chem. *281*, 32207–32216.

Tao, R., Gong, J., Luo, X., Zang, M., Guo, W., Wen, R., and Luo, Z. (2010). AMPK exerts dual regulatory effects on the PI3K pathway. J. Mol. Signal. 5. 1750-2187.

Thoreen, C.C., and Sabatini, D.M. (2009). Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely. Autophagy 5, 725–726.

Tolleshaug, H., Goldstein, J.L., Schneider, W.J., and Brown, M.S. (1982). Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia. Cell *30*, 715–724.

Valacchi, G., Sticozzi, C., Lim, Y., and Pecorelli, A. (2011). Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1229*, E1–E7.

Viollet, B., Andreelli, F., Jørgensen, S.B., Perrin, C., Geloen, A., Flamez, D., Mu, J., Lenzner, C., Baud, O., Bennoun, M., et al. (2003). The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. J. Clin. Invest. *111*, 91–98.

Viollet, B., Athea, Y., Mounier, R., Guigas, B., Zarrinpashneh, E., Horman, S., Lantier, L., Hebrard, S., Devin-Leclerc, J., Beauloye, C., et al. (2009). AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. Front. Biosci. Landmark Ed. *14*, 19–44.

Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., and Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. Clin. Sci. *122*, 253–270.

Wang, L., Duan, Q., Wang, T., Ahmed, M., Zhang, N., Li, Y., Li, L. and Yao, X. (2015). Mitochondrial respiratory chain inhibitors involved in ROS production induced by acute high concentrations of iodide and the effects of SOD as a protective factor. Oxid Med Cell Longev, vol. 2015. 14 pages. 217670.

Wilcock, C., and Bailey, C.J. (1994). Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst. 24, 49–57.

Woods, A., Salt, I., Scott, J., Hardie, D.G., and Carling, D. (1996). The alpha1 and alpha2 isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro. FEBS Lett. *397*, 347–351.

Wu, Y., Song, P., Xu, J., Zhang, M., and Zou, M.-H. (2007). Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. J. Biol. Chem. 282, 9777–9788.

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

Xu, S., Jay, A., Brunaldi, K., Huang, N., and Hamilton, J.A. (2013). CD36 enhances fatty acid uptake by increasing the rate of intracellular esterification but not transport across the plasma membrane. Biochemistry (Mosc.) *52*, 7254–7261.

Yamamoto, T., Davis, C.G., Brown, M.S., Schneider, W.J., Casey, M.L., Goldstein, J.L., and Russell, D.W. (1984). The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. Cell *39*, 27–38.

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.

You, L., Sheng, Z., Tang, C., Chen, L., Pan, L., and Chen, J. (2011). High cholesterol diet increases osteoporosis risk via inhibiting bone formation in rats. Acta Pharmacol. Sin. *32*, 1498–1504.

Yu, P.B., Hong, C.C., Sachidanandan, C., Babitt, J.L., Deng, D.Y., Hoyng, S.A., Lin, H.Y., Bloch, K.D., and Peterson, R.T. (2008). Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. Nat. Chem. Biol. *4*, 33–41.

Zakikhani, M., Blouin, M.-J., Piura, E., and Pollak, M.N. (2010). Metformin and rapamycin have distinct effects on the AKT pathway and proliferation in breast cancer cells. Breast Cancer Res. Treat. *123*, 271–279.

Zhang, Y., Ahmed, A.M., Tran, T.L., Lin, J., McFarlane, N., Boreham, D.R., Igdoura, S.A., Truant, R., and Trigatti, B.L. (2007). The inhibition of endocytosis affects HDLlipid uptake mediated by the human scavenger receptor class B type I. Mol. Membr. Biol. *24*, 442–454.

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., et al. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J. Clin. Invest. *108*, 1167–1174.

Zhou, J., Huang, W., Tao, R., Ibaragi, S., Lan, F., Ido, Y., Wu, X., Alekseyev, Y.O., Lendburg, M.E., Hu, G., et al. (2009). Inactivation of AMPK alters gene expression and promotes growth of prostate cancer cells. Oncogene *28*, 1993–2002.

Zhu, Y., Zhou, J., Ao, R., and Yu, B. (2014). A-769662 protects osteoblasts from hydrogen dioxide-induced apoptosis through activating of AMP-Activated protein kinase (AMPK). Int. J. Mol. Sci. *15*, 11190–11203.

Zoncu, R., Efeyan, A., and Sabatini, D.M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *12*, 21–35.

Zorn, J.A., and Wells, J.A. (2010). Turning enzymes ON with small molecules. Nat. Chem. Biol. *6*, 179–188.