

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET DE L'ACTIVATION DE L'AMPK SUR LE MÉTABOLISME DES
LIPOPROTÉINES CHEZ LA SOURIS

MÉMOIRE PRÉSENTÉ COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

GHIZLANE GAUGAOU

MAI 2013

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.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Dre Louise BRISSETTE de m'avoir acceptée au sein de son laboratoire. Je la remercie également pour sa rigueur, pour ses compétences scientifiques, sa disponibilité et pour sa patience. J'ai beaucoup apprécié son humanité et soutien moral.

Ce travail n'aurait pu se faire sans la participation de mon co-directeur Dr David RHAINDS que je remercie pour ses propositions et ses conseils.

Je remercie également Madame Louise FALSTRAULT et l'équipe de l'animalerie de l'UQAM pour leur soutien technique et leur formation.

Je tiens à remercier plus particulièrement François DALLAIRE et Mohamed Ali ALI BENALI qui m'ont aidé à réaliser une partie de ce travail.

Je remercie grandement ma collègue Sonia ALEM et les membres du laboratoire du Dr Robert MOREAU.

Finalement, j'aimerais offrir un remerciement particulier à mon mari Khalid à mon fils Mohamed Yanis et à ma famille au Maroc qui m'ont toujours encouragée durant mes études.

Table des matières

Liste des figures	v
Liste des tableaux.....	iv
Liste des abréviations.....	iiiv
Résumé.....	iiiiv
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	1
1.1 Métabolisme des lipoprotéines et synthèse du cholestérol.....	1
1.2 Récepteurs et protéines assurant leur régulation	3
1.2.1 Structure et fonctions du rLDL	3
1.2.2 Régulation de l'expression du rLDL	5
1.2.3 Structure et fonctions des SR-B.....	7
1.2.4 Régulation de l'expression des récepteurs SR-B	9
1.2.5 Le «Cluster of Differentiation-36».....	10
1.3 Maladies métaboliques et AMPK.....	11
1.3.1 Maladies métaboliques.....	11
1.3.2 Structure de l'AMPK et son association au métabolisme énergétique	12
1.3.3 Produits permettant l'activation de l'AMPK	14
1.3.3.1 Metformine	14
1.3.3.2 Le 5-aminoimidazole-4-carboxiamide-1- β - D-ribofuranoside.....	14
1.3.4 Association entre l'activité de l'AMPK et le métabolisme des lipoprotéines	16
1.4 Problématique.....	19
CHAPITRE II	
MÉTHODOLOGIE.....	20
2.1 Méthodologie générale.....	20
2.2 Prélèvement du foie et du plasma	20
2.3 Quantification des niveaux de cholestérol de LDL et HDL plasmatiques	21
2.4 Quantification des niveaux de certaines protéines hépatiques	21
2.5 Quantification des niveaux des ARNm hépatique.....	22

2.6 Isolement et marquage radioactif des LDL et HDL	23
2.7 Clairance <i>in vivo</i> des lipoprotéines marquées	25
2.8 Étude statistique	26
CHAPITRE III	
RÉSULTATS	29
3.1 Effets de l'AICAR et de la metformine sur les taux de cholestérol plasmatique.....	29
3.2 Effets de l'AICAR et de la metformine sur les taux de récepteurs et protéines impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines.....	32
3.3 Effets de l'AICAR et de la metformine sur les taux des ARNm de SR-BI, du rLDL et de la PCSK9	34
3.4 Effet de l'AMPK sur les protéines ABCA1 et HNF4 α	36
3.5 Effets de l'AICAR et de la metformine sur les taux de cholestérol hépatique et des triglycérides	37
3.6 Clairance <i>in vivo</i> des LDL et des HDL marquées	39
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	43
4.1 Effet de l'AMPK sur les HDL.....	43
4.2 Effet de l'AMPK sur les LDL	45
4.3 Effet de l'AMPK sur les lipides hépatiques	46
4.4 Synthèse générale.....	47
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	49
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	51

Liste des figures

Figure	Page
1.1 Structure générale des lipoprotéines	1
1.2 Trafic cellulaire et régulation du rLDL.....	4
1.3 Schéma du transport inverse de cholestérol.....	9
1.4 Phosphorylation de l'AMPK par l'AICAR et la metformine	15
3.5 Effet de l'AICAR et de la metformine sur le taux de cholestérol plasmatique	31
3.6 Niveaux hépatiques des protéines PDZK1, SREBP-2, LXR α et des récepteurs SR-BI, SR-BII, rLDL et CD36.....	33
3.7 Quantification de l'ARNm de SR-BI, du rLDL et de la PCSK9.....	35
3.8 Niveaux hépatiques des protéines ABCA1 et HNF4 α intervenant dans le métabolisme des HDL.....	37
3.9 Effet du traitement avec l'AICAR ou la metformine sur les taux hépatiques de cholestérol et de triglycérides.....	38
3.10 Clairance <i>in vivo</i> des LDL injectées à des souris contrôles ou traitées avec l'AICAR.....	40
3.11 Clairance <i>in vivo</i> des HDL injectées à des souris contrôles ou traitées avec l'AICAR	41
3.12 FCR moyens des lipoprotéines injectées à des souris contrôles ou traitées avec l'AICAR.....	42
4.13 Effet de la phosphorylation de l'AMPK sur le métabolisme des lipoprotéines chez la souris.....	47

Liste des tableaux

Tableau	Page
1.1 Effet de l'AICAR et la metformine sur le métabolisme des acides gras et des glucides	16
1.2 Effets de l'administration de la metformine et de l'AICAR sur des éléments du métabolisme des lipoprotéines	18
2.3 Dilutions de l'AC1 et l'AC2 utilisées pour la détection des protéines et récepteurs	22
2.4 Séquences nucléotidiques des oligomères spécifiques des différentes protéines	23
3.5 Effet de différentes doses d'AICAR sur le métabolisme lipidique et glucidique de la souris.....	28
3.6 Effet de différentes doses de metformine sur le métabolisme lipidique et glucidique de la souris.....	29
4.7 Récapitulatif de l'effet de l'AICAR et de la metformine sur le taux de cholestérol plasmatique en termes de pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport aux résultats des souris contrôles	32
4.8 Récapitulatif de l'effet de l'AICAR et de la metformine sur le taux d'ARNm de SR-BI, du rLDL et de PCSK9 en termes de pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport aux résultats des souris contrôles	36
4.9 Récapitulatif de l'effet du traitement avec l'AICAR ou la metformine sur les taux hépatiques de cholestérol et de triglycérides en termes de pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport aux résultats des souris contrôles	38

Liste des abréviations

ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
AC1	Anticorps primaire
AC2	Anticorps secondaire
ACC	Acétyl-CoA carboxylase
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide
AMPK	Adenosine monophosphate activated protein kinase
apo	Apolipoprotéine
BSA	Albumine de sérum bovin
CD36	Cluster of Differentiation-36
CETP	Cholesterol ester transfer protein
CL	Cholestérol libre
EC	Esters de cholestérol
EDTA	Éthylène diamine tétraacétate
FAT	Fatty acid translocase
FCR	Fraction catabolic rate
Glp1r	Glucagon-like peptide 1 receptor
GPAT	Glycérol-3-phosphate acyltransférase
HDL	Lipoprotéines de densité élevée
HMG-CoA réd	3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase
IDL	Lipoprotéines de densité intermédiaire
IDOL	Inducible degrader of LDLr
KO	Knockout
LDL	Lipoprotéine de faible densité
OCT1	Organic cation uptake transporter

Résumé

L'activation de l' « Adenosine monophosphate activated protein kinase » (AMPK), enzyme clé de la régulation du métabolisme énergétique, permet une inhibition de certaines enzymes limitantes du métabolisme des acides gras et du cholestérol. Le 5-aminoimidazole-4-carboxiamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) et la metformine, médicaments largement utilisés pour activer l'AMPK, améliorent l'hyperglycémie, augmentent la captation du glucose périphérique et favorisent l'utilisation et la dégradation des acides gras, ce qui permet la diminution des risques du développement de maladies cardiovasculaires liées au diabète. L'étude de certains effets de l'activation de l'AMPK sur le métabolisme lipidique serait essentielle pour pouvoir mieux comprendre l'interaction entre les métabolismes lipidique et glucidique. L'objectif de ce travail était de savoir si, *in vivo*, le métabolisme des lipoprotéines réagit à l'activation de l'AMPK. Le traitement des souris avec 0,5 mg/g de poids corporel d'AICAR ou de metformine pendant 7 ou 14 jours a permis d'observer notamment pour le traitement à l'AICAR pendant 14 jours, une diminution de 17,5% du cholestérol plasmatique, de 21,1% du cholestérol associé aux HDL et une augmentation de 47,6% du cholestérol associé aux LDL. L'activation de l'AMPK a augmenté le niveau protéique de récepteurs des lipoprotéines de faible densité (rLDL) suite à l'augmentation de son facteur de transcription « sterol regulatory element binding protein 2 » (SREBP-2) et a diminué celui de SR-BI « Scavenger receptor class B type I » et de sa protéine adaptatrice PDZK1. Les taux protéiques de SR-BI et du rLDL corrélaient avec ceux de leurs ARNm. La protéine SR-BII a augmenté probablement pour contrebalancer la diminution de SR-BI. La diminution de l'expression de SR-BI a provoqué une diminution de 37% de la captation sélective des EC des lipoprotéines de haute densité (HDL) *in vivo* chez la souris traitée avec 0,5 mg/g de poids corporel d'AICAR. Les protéines ABCA1 (intervenant dans l'efflux de cholestérol vers les HDL) et HNF4 α (responsable de l'expression de l'apoA-I qui compose les HDL) ont diminué et seraient peut-être responsables de la diminution du cholestérol associé aux HDL. L'ARNm de PCSK9 « Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 » a augmenté. De plus, ni l'augmentation de rLDL ni la diminution de SR-BI n'ont pu expliquer l'augmentation du taux de cholestérol associé aux LDL. Au niveau du foie, principal tissu responsable du métabolisme de lipoprotéines, des diminutions de 26% des triglycérides et de 13,4% du cholestérol ont été observées. L'activation de l'AMPK semble donc améliorer le bilan lipidique du foie ainsi que celui du cholestérol plasmatique. Toutefois, la diminution du cholestérol associé aux HDL et l'augmentation de celui associé aux LDL apparaissent défavorables en termes de risque d'événements cardiovasculaires.

Mots clés : AMPK, récepteurs hépatiques, captation sélective, LDL-EC, lipides hépatiques.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Métabolisme des lipoprotéines et synthèse du cholestérol

Les lipoprotéines, système physico-chimique d'interactions lipides-protéines, permettent le transport dans le plasma des lipides insolubles dans l'eau grâce à leurs associations avec une ou plusieurs protéines spécifiques appelées apolipoprotéines (apo) ou apoprotéines (Brown *et al.*, 1974). Ainsi, les lipoprotéines permettent le transport des lipides de leurs lieux de synthèse vers les tissus et les organes cibles. Tel que le démontre la figure 1, elles sont composées d'un noyau hydrophobe, comprenant les triglycérides (TG) et les esters de cholestérol (EC), entouré d'une monocouche de phospholipides, de cholestérol libre (CL) et d'apolipoprotéines (Goldstein *et al.*, 1979).

Les différentes classes de lipoprotéines se distinguent en fonction de leurs densités, leurs compositions relatives en lipides et en protéines, leurs fonctions et leurs lieux de synthèse (Brown *et al.*, 1979). Ainsi, on distingue les chylomicrons, les lipoprotéines de faible densité (LDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et les lipoprotéines de densité élevée (HDL) (Windmueller *et al.*, 1973).

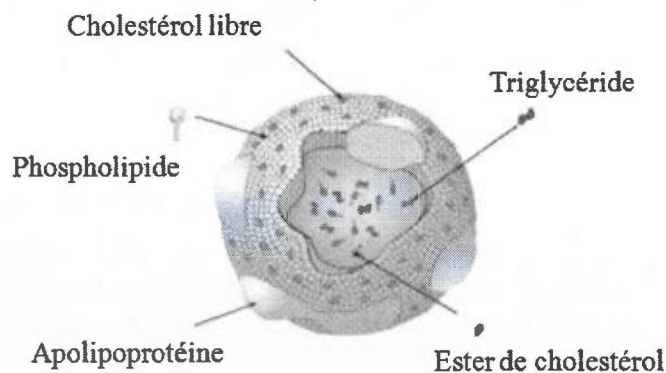


Figure 1 : Structure générale des lipoprotéines (adapté de Kostner, 2002). La lipoprotéine est constituée d'un cœur lipidique sous forme d'EC et des TG, entouré de cholestérol libre, de phospholipides et d'apolipoprotéines.

Les chylomicrons sont synthétisés par les entérocytes (cellules intestinales) à partir des lipides exogènes (provenant de l'alimentation). Elles sont constituées principalement par l'apoB-48 qui est essentielle pour leur formation, leur sécrétion et leur métabolisme (Hussain *et al.*, 1996). Ainsi, une modification post-transcriptionnelle de l'ARNm qui code pour l'apoB-100 produit la forme tronquée apoB-48 (Powell *et al.*, 1987). La présence d'apoC-II à la surface des chylomicrons est un cofacteur indispensable à l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) associée aux cellules endothéliales. Cette enzyme hydrolyse les TG des chylomicrons et les acides gras libres ainsi libérés peuvent être utilisés comme source d'énergie ou stockés par les adipocytes (LaRosa *et al.*, 1970).

Les VLDL sont synthétisées par les hépatocytes à partir des triglycérides endogènes qui en sont le principal constituant, et d'apolipoprotéines, en particulier l'apoB100; elles sont ensuite sécrétées par exocytose dans le sang. Les VLDL naissantes acquièrent dans la circulation des apoC-II et E venant des HDL qui leur cèdent également du cholestérol (Brown *et al.*, 1979). Au niveau du plasma, la LPL activée par l'apoC-II et la lipase hépatique (LH) provoque une hydrolyse des TG des VLDL, ce qui aboutit à la formation des IDL (Sigurdsson *et al.*, 1975). Ainsi, via les récepteurs de LDL (rLDL) qui reconnaissent l'apoB100 et l'apoE, le foie capte et dégrade une partie de ces IDL. L'autre partie subit encore l'action de la LPL et de la LH, ce qui mène à la formation des LDL.

Les LDL sont positivement associées aux maladies cardiovasculaires (Brown *et al.*, 1979). En effet, une fois infiltrées dans l'intima, les LDL peuvent être oxydées (LDL oxydées (LDLox)) par les macrophages ou par des cellules endothéliales et peuvent être par la suite libérées dans la circulation sanguine (Zhang et Whahl, 2006). Chez les personnes normales, des anticorps anti-LDLox peuvent éliminer la majorité de ces LDLox. Par contre, chez les personnes hyperglycémiques tels les diabétiques, la glycation favorise fortement l'oxydation des LDL qui deviennent très difficiles à éliminer à cause de leur forte concentration (Sobal *et al.*, 2000). Ces LDL oxydées sont fortement impliquées dans le processus d'athérosclérose. Elles sont considérées comme de nouveaux marqueurs pour évaluer les risques cardiovasculaires (Steinberg et Witztum, 2010).

Les HDL sont formées principalement par le foie et en faible quantité par les intestins. Elles sont sécrétées par exocytose dans la circulation sanguine comme des particules constituées d'apolipoprotéines et de phospholipides (Windmueller *et al.*, 1973). Elles peuvent aussi provenir du catabolisme des chylomicrons et des VLDL (Eisenberg et Levy, 1975). Elles se caractérisent par une taille et une masse beaucoup plus faibles que celles des LDL. Les apolipoprotéines les plus abondantes des HDL sont les apoA-I et A-II, mais elles peuvent aussi porter les différentes apoC et l'apoE. Les HDL peuvent être divisées en pré β ₁-HDL, HDL_{3c}, HDL_{3b} et HDL_{3a} ainsi qu'en HDL_{2a} et HDL_{2b}+pré β ₂HDL selon leur densité. Malgré les nombreuses données épidémiologiques suggérant un rôle protecteur des HDL, il reste à déterminer les propriétés anti-athérogéniques des différentes particules qui composent cette classe de lipoprotéines (Brewer, 2007). Une autre étude a montré une association des particules de HDL de petites tailles aux risques accrus de maladies cardiovasculaires. La résistance progressive à l'insuline a été associée à une diminution de la taille des HDL qui résulte de l'épuisement des particules HDL_{2a} et HDL_{2b} (Arsenault *et al.*, 2009).

1.2 Récepteurs et protéines assurant leur régulation

1.2.1 Structure et fonctions du rLDL

Le rLDL est une glycoprotéine de 839 acides aminés (160 kDa) dont l'extrémité C-terminale est intracellulaire (Brown et Goldstein, 1986). Environ 70% des rLDL sont exprimés au niveau du foie, le 30% restant étant exprimé dans les glandes surrénales, les ovaires et d'autres tissus extra-hépatiques (Brown et Goldstein, 1986). Ce récepteur reconnaît l'apoB100 ou l'apoE des lipoprotéines. Notamment, comme le démontre l'étape 1 de la figure 2, il fait entrer les LDL dans la cellule (internalisation) par endocytose dépendante de la clathrine qui donne lieu à la dégradation complète des lipoprotéines dans les lysosomes (étape 2), libérant ainsi le cholestérol dont la cellule a besoin (étape 4). Le rLDL peut être recyclé vers la membrane cellulaire (étape 3). Il est à noter que les autres étapes de la figure 2 seront décrites plus loin dans le texte.

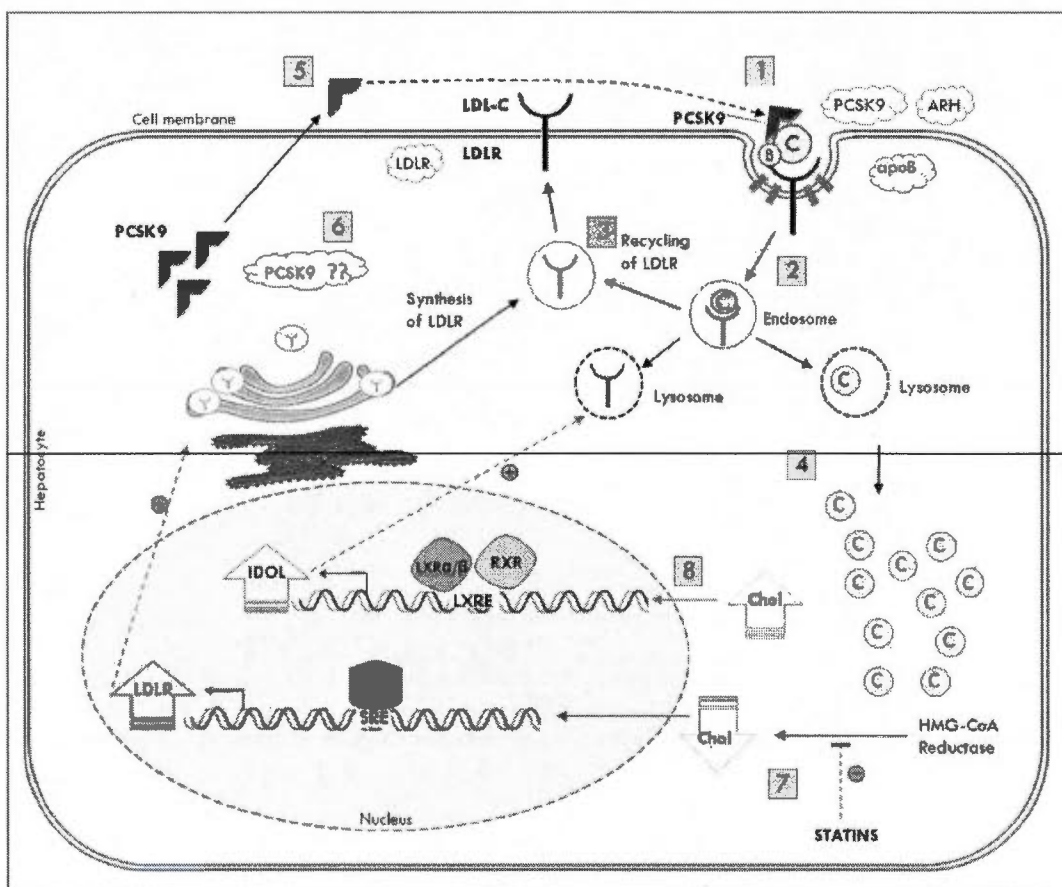


Figure 2 : Catabolisme et régulation du rLDL (Fahed et Nemer, 2011). LDL-C : cholestérol associé aux LDL. C : cholestérol. Le rLDL internalise la LDL à l'intérieur de la cellule où elle sera dégradée via les lysosomes libérant ainsi le cholestérol libre dont la cellule a besoin. Une déficience en cholestérol active le processus de synthèse de rLDL. Dans le cas contraire, le processus de dégradation de rLDL est ainsi activé. Cette augmentation de cholestérol inhibe aussi la synthèse du rLDL.

Chez des patients présentant un rLDL ou une apoB100 défectueux, une hypercholestérolémie a été observée de même qu'un taux plus élevé de maladies cardiovasculaires (Brugger *et al.*, 1996). Aussi, chez des souris rLDL «knockout» KO, des taux élevés de cholestérol plasmatique, de LDL et IDL ainsi qu'une augmentation du stockage des lipides ont été observés (Ishibashi *et al.*, 1993). Ces cas démontrent bien l'importance physiologique du rLDL.

1.2.2 Régulation de l'expression du rLDL

Pour maintenir le niveau du cholestérol cellulaire, le cholestérol libre issu de la dégradation des LDL diminue l'expression du gène du rLDL pour limiter la captation des LDL (Brown et Goldstein, 1974). L'expression du gène qui code pour «3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase» (HMG-CoA réd) est aussi réduite pour inhiber la synthèse du cholestérol endogène (Saucier *et al.*, 1989). Des études ont montré que l'équilibre du cholestérol cellulaire est maintenu par des facteurs de transcription ancrés à la membrane du réticulum endoplasmique : les « Sterol regulatory element binding protein » (SREBP) (Eberle *et al.*, 2004). Deux gènes encodant deux formes de SREBP sont connues avec une similitude de 47%: SREBP-1 et SREBP-2. Elles ont un même poids moléculaire (125 kDa) et leurs domaines fonctionnels sont similaires. SREBP-1 intervient dans l'expression constitutive des rLDL alors que SREBP-2 réagit fortement au taux de cholestérol dans les cellules hépatiques (Brown et Goldstein, 1997). SREBP-2 joue un rôle essentiel dans l'expression des ARNm du rLDL (Horton *et al.*, 1998; Castoreno, 2005). Après leur synthèse, les SREBPs forment un complexe avec la protéine SCAP (« SREBP cleavage-activating protein ») et ils s'accumulent dans le réticulum endoplasmique (RE) comme des précurseurs inactifs (proSREBPs). Une déficience en stérol provoquera une translocation du complexe proSREBP2/SCAP du RE vers l'appareil de Golgi où les proSREBPs, via les protéases S1P et S2P, se transforment en SREBPs (matures) permettant ainsi à l'extrémité N-terminale de pénétrer à l'intérieur du noyau. Par conséquent, il y aura activation de l'expression du gène du rLDL (Brown et Goldstein, 1997), tel que le démontre l'étape 7 de la figure 2, et même de celui de l'HMGCoA réd, car ce facteur de transcription mature se lie au «sterol responsive element» (SRE) de ces deux gènes.

Le rLDL est également régulé par la «Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9» (PCSK9) qui est une glycoprotéine de 60 kDa constituée de 692 acides aminés, fortement exprimée au niveau du foie (Abifadel *et al.*, 2003). Ni et ses collaborateurs (2010) ont montré que la PCSK9 plasmatique se lie aux rLDL à la surface cellulaire et entraîne leur dégradation par les lysosomes (Figure 2, étape 5). Il en résulte un plus faible niveau de rLDL et conséquemment plus de LDL en circulation. Cependant, l'existence d'une voie

intracellulaire (Figure 2, étape 6) permettant une dégradation du rLDL médiée par PCSK9 reste à démontrer (Fahed et Nemer, 2011). Le gène qui code pour PCSK9 est aussi une cible de SREBP-2 (Horton *et al.*, 2007). L'expression de PCSK9 est donc augmentée lorsque la concentration de cholestérol cellulaire est faible. Ainsi, un faible taux de cholestérol hausse la quantité de rLDL alors qu'il entraîne aussi une dégradation accrue de rLDL par une concentration plus élevée en PCSK9. D'ailleurs, les statines qui diminuent le taux de cholestérol associé aux LDL via une inhibition de l'HMGCoA réductase, augmentent le taux des SREBP et par conséquent accroissent la transcription du gène de rLDL ainsi que sa traduction en protéine (Figure 2, étape 7) (Matsuyama *et al.*, 2005). Ainsi, l'augmentation de SREBP induit l'expression de PCSK9 qui pourrait atténuer l'effet des statines sur le rLDL (Rashid *et al.*, 2005). Nonobstant ce paradoxe qui a amené plusieurs chercheurs à développer des stratégies cliniques afin d'inhiber l'activité de PCSK9 chez l'humain, il demeure approprié d'étudier les niveaux de PCSK9 après avoir fait une étude complète du taux d'expression du rLDL.

Les « Liver X receptor » (LXR) sont connus pour lier différents précurseurs ou dérivés de cholestérol servant ainsi de « détecteurs de cholestérol » qui stimulent le transport inverse du cholestérol qui sera vu en détails plus loin. En cas d'excès de cholestérol, les LXR activent l'expression de nombreux gènes intervenant dans le transport et le métabolisme des stérols (Wojcicka *et al.*, 2007). Bien que les LXRs semblent réguler un ensemble similaire de gènes cibles, leurs profils d'expression sont différents : le LXR α inducible est abondamment exprimé dans le foie, tandis que le LXR β est exprimé de manière ubiquitaire (Zhao et Dahlman-Wright, 2010). Le LXR α joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol (Peet *et al.*, 1998). Des études ont montré que l'administration d'un agoniste de LXR α induit l'expression de l'«inducible degrader of LDLr» (IDOL) (Zelcer *et al.*, 2009). L'IDOL est une ubiquitine ligase E3 favorisant la dégradation lysosomale du rLDL polyubiquitinylé et de sa cible transcriptionnelle LXR α (et probablement LXR β) (Figure 2, étape 8) (Zelcer *et al.*, 2009). D'ailleurs, Engelking et ses collaborateurs (2012) ont montré que l'ézétimibe (médicament permettant la diminution de l'absorption du cholestérol alimentaire par l'intestin) provoque une augmentation de l'expression du rLDL. Ceci proviendrait d'une augmentation de

SREBP-2 et d'une diminution de l'expression d'IDOL due à une réduction de l'activité transcriptionnelle du LXR.

1.2.3 Structure et fonctions des récepteurs SR-B

Le groupe du Dr Krieger a découvert, chez les rongeurs, le SR-BI et a démontré que ce récepteur reconnaît les LDL, HDL, VLDL, les différentes apolipoprotéines et les LDL modifiées (Acton *et al.*, 1994 et 1996). C'est une protéine de la membrane plasmique de 85 KDa en forme de fer à cheval avec deux domaines intracellulaires séparés par un grand domaine extracellulaire. Ce récepteur est exprimé dans le foie et les tissus stéroïdogéniques des rongeurs (Landschultz *et al.*, 1996) et humains (Cao *et al.*, 1997). Le gène SCARB1 qui code pour le SR-BI est constitué de 13 exons. L'épissage alternatif de ce gène (par délétion de l'exon 12) produit un ARNm codant pour une forme courte, soit le SR-BII. SR-BI et SR-BII, ont une distribution tissulaire différente et peuvent influencer le transport et l'homéostasie du cholestérol cellulaire de différente manière (Eckhardt *et al.*, 2004).

Le SR-BI a premièrement été démontré comme un récepteur captant sélectivement les EC des HDL (Acton *et al.*, 1996). Plus tard, des études (Webb *et al.*, 1998) ont montré que le SR-BII est moins abondant et moins actif dans la captation sélective des EC que le SR-BI. Même si le SR-BI peut capter tous les types de lipides contenu dans les HDL, il capte davantage les TG et EC. De plus, l'enrichissement des HDL en TG diminue la captation sélective des EC (Greene *et al.*, 2001). SR-BI exercerait son action par un mécanisme de rétroendocytose. Ainsi, Silver et ses collaborateurs (2001) ont démontré que la voie hépatique murine de SR-BI implique une transcytose de SR-BI, une rétroendocytose des particules HDL, une sélection intracellulaire des lipides et une sécrétion apicale des HDL appauvries en lipides. Ces résultats furent confirmés par Rhainds et ses collaborateurs (2004) chez les cellules HepG2.

L'importance métabolique du récepteur SR-BI a été démontrée par Rigotti et ses collaborateurs (1997). Cette étude a montré que chez des souris SR-BI KO, le taux de HDL-CE plasmatique augmente de 125%, alors qu'une autre étude a montré que la

surexpression de SR-BI protège les souris contre l'athérosclérose (Kozarsky *et al.*, 2000). Le groupe de Dre Brissette a d'ailleurs démontré que les SR-BI des cellules hépatiques étaient, en fait, responsables de 85% de la captation sélective de HDL-EC (Rhains *et al.*, 2003), mais son groupe s'est davantage intéressé à définir et démontrer que le SR-BI était aussi actif envers les LDL. Des études menées avec des cellules HepG2 normales ou déficientes en SR-BI, ainsi que des cellules hépatiques de souris sauvages ou KO en SR-BI, ont montré que le SR-BI est responsable de 85% de la captation sélective des EC des LDL au niveau du foie (Rhains *et al.*, 2003). De plus, des expériences de clairance plasmatique ont montré que la captation sélective des EC des LDL se produit chez les souris sauvages alors qu'elle est perdue en phase initiale de clairance chez les souris SR-BI KO (Brodeur *et al.*, 2005).

Le SR-BI est responsable du flux bidirectionnel du cholestérol, car il est aussi capable de provoquer l'efflux du cholestérol cellulaire vers les HDL de la circulation (Ji *et al.*, 1997). Il contribue donc de deux façons au transport inverse du cholestérol dont les détails apparaissent à la figure 3. Brièvement, tel que revu par Annema et Tietge (2011), des HDL pauvres en cholestérol procèdent à l'efflux de cholestérol membranaire de macrophages et cellules endothéliales par l'«ATP-binding cassette transporter A1» (ABCA1), l'ABCG1 et le SR-BI. Ce cholestérol nouvellement associé aux HDL est estérifié par la lécithine:cholestérol acyltransférase (LCAT). Deux voies principales contribuent au transport inverse du cholestérol. La première implique la captation des EC des HDL par le SR-BI alors que la deuxième relève d'échanges entre les EC des HDL et les TG des VLDL et LDL grâce à la «cholesteryl ester transfer protein» (CETP). Il est à noter que cette protéine est exprimée chez l'Homme mais elle est absente chez les souris et les rats (Jiao *et al.*, 1990). Ces VLDL et LDL ainsi chargées d'EC provenant de l'efflux de cholestérol des tissus périphériques seront captées par le rLDL hépatique. Ce cholestérol de provenance périphérique sera sécrété tel quel dans la bile ou sous forme d'acides biliaires. Cette même figure décrit aussi le remodelage des HDL grâce à la lipase endothéliale (EL) et la HL.

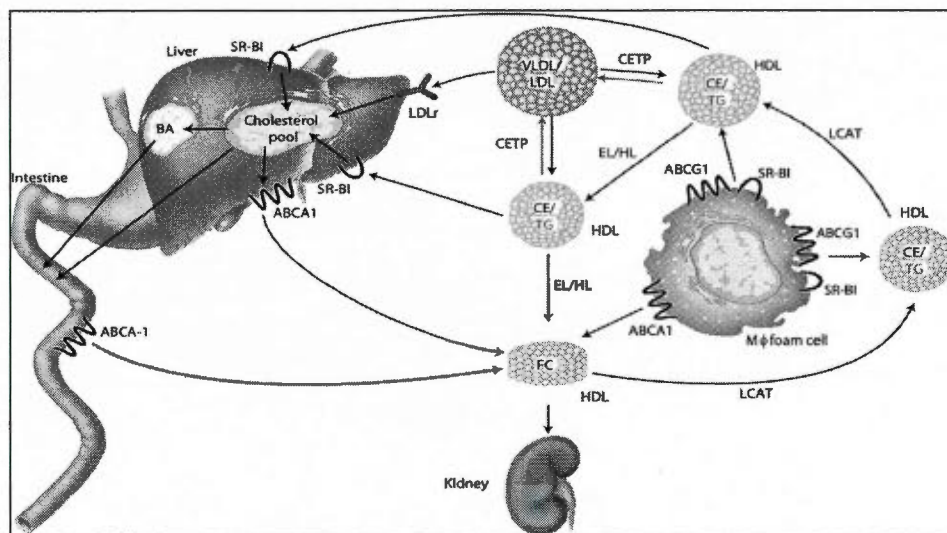


Figure 3 : Schéma du transport inverse de cholestérol (Annema et Tietge, 2011). Le SR-BI, les ABCA1 et ABCG1 interviennent dans l'efflux de cholestérol vers les HDL. Ce cholestérol sera estérifié par la LCAT. Le transport inverse du cholestérol implique à la fois le SR-BI qui capte les EC des HDL et un échange entre les EC des HDL et les TG des VLDL et LDL.

1.2.4 Régulation de l'expression des récepteurs SR-B

La régulation du gène SR-BI en fonction du niveau de cholestérol plasmatique est moins bien définie que celle du rLDL. Toutefois des études ont montré qu'un régime riche en cholestérol mène à une diminution du taux d'expression de SR-BI dans les hépatocytes de rat (Fluiter *et al.*, 1998). Aussi, une étude (Niemeier *et al.*, 2009) a montré qu'un excès de cholestérol aboutit à une régulation négative post-traductionnelle de l'expression de SR-BI de foie de souris due à une diminution de «PDZ domain containing 1» (PDZK1), une protéine adaptatrice permettant de maintenir SR-BI à la surface cellulaire (Kocher *et al.*, 2003). D'ailleurs, l'inactivation chez la souris du gène qui code pour PDZK1 provoque la suppression de la quasi-totalité (95%) de l'expression de SR-BI dans le foie, alors que le niveau de SR-BI diminue de 50% dans l'intestin grêle et reste inchangé dans les macrophages et les organes stéroïdogènes tels que le cortex surrénalien, l'ovaire et le testicule (Kocher et Krieger, 2009). Ces souris PDZK1 KO présentent d'ailleurs un niveau 1,7 fois plus élevé de cholestérol sérique (Kocher *et al.*, 2003). Ces résultats sont donc similaires (mais pas aussi marqués) à ceux observés chez les souris SR-BI KO (Rigotti *et al.*, 1997). En raison de leurs rôles dans la régulation du métabolisme des

lipoprotéines, PDZK1 et SR-BI sont considérés comme des protéines athéroprotectrices (Yesilaltay *et al.*, 2009).

La régulation du gène SCARB1 (qui code pour la protéine «Scavenger receptor class B member 1») par l'oestrogène influence l'expression relative des deux isoformes SR-BI et SR-BII (Lopez *et al.*, 2006). Chez les rongeurs, le traitement avec des doses élevées d'oestrogène provoque la suppression de SR-BI alors qu'il augmente l'expression de SR-BII (Zhang *et al.*, 2007). Le même résultat a été observé au niveau des cellules HepG2 humaines traitées à l'oestradiol (Graf *et al.*, 2001).

I-2-5 Le «Cluster of Differentiation-36»

La structure, la taille et les ligands de CD36 sont similaires à ceux de SR-BI (Calvo *et al.*, 1998). CD36 a été détecté au niveau des cellules hépatiques (Maeno *et al.*, 1994), des monocytes et des macrophages (Greenwalt *et al.*, 1992). Des recherches comparatives entre le CD36 et le SR-BI ont établi que le CD36 est capable de faire la captation sélective des EC des HDL, mais qu'il est 7 fois moins efficace que le SR-BI (Connelly *et al.*, 1999).

Le groupe de Dr Brissette a démontré que la clairance des EC des LDL chez des souris SR-BI KO est retardée peu de temps après l'injection par rapport à celle observée chez les souris sauvages. Cependant, après deux heures, les EC des LDL disparaissent plus rapidement chez les souris SR-BI KO que chez les souris sauvages (Brodeur *et al.*, 2005). Il fut alors suggéré que le CD36 serait impliqué dans cette deuxième phase de clairance lorsque le SR-BI est absent. Par la suite, son groupe a étudié la clairance des EC des LDL chez des souris SR-BI/CD36 double KO et a démontré une absence de captation sélective révélant, ainsi, qu'en absence de SR-BI, CD36 est apte à réaliser la captation sélective des EC-LDL (Luangrath *et al.*, 2008). De plus, il fut révélé dans cette même étude que le CD36 nuit à la captation des LDL par le rLDL, mais est responsable de la capture des LDLox.

Des recherches faites sur des souris sauvages et des souris CD36 KO ont montré l'implication du CD36 dans la formation, la sécrétion et la clairance des lipoprotéines intestinales (Nauli *et al.*, 2006). Tran et ses collaborateurs (2011) ont démontré que les CD36 intestinaux jouent un rôle de récepteurs de lipides d'origine alimentaire permettant la transmission des signaux cellulaires stimulant ainsi la synthèse des chylomicrons. D'autre part, le CD36 intervient dans la captation des acides gras par le muscle squelettique et dans leurs stockages au niveau du sarcolemme (Bonen *et al.*, 2000). Il est d'ailleurs aussi connu sous le nom de «Fatty acid translocase» (FAT).

La régulation du gène codant pour ce récepteur est complexe (Andersen *et al.*, 2006). Cette protéine est soumise à des régulations post-traductionnelles spécifiques dans chaque tissu où elle est exprimée (Rac *et al.*, 2007). Notamment, la régulation de l'expression de CD36 est fort bien connue par rapport à la présence de LDLox qui l'induit par l'activation du «peroxisome proliferator-activated receptor γ » (PPAR γ) (Tontonoz *et al.*, 1998). Le CD36 est également une cible de LXR en réponse aux LDLox (Malerød *et al.*, 2002).

1.3 Maladies métaboliques et AMPK

1.3.1 Maladies métaboliques

En plus du diabète, du tabagisme, de l'hypertension et de l'obésité, l'hypercholestérolémie associée à un niveau élevé du cholestérol lié aux LDL constitue un facteur de risque principal pour le développement des maladies cardiovasculaires (Yusuf *et al.*, 2004). Des essais cliniques avec des inhibiteurs l'HMG-CoA réductase ont montré que l'abaissement du taux de cholestérol associé aux LDL provoque une diminution du risque des maladies cardiovasculaires (Baigent *et al.*, 2005). Parmi ces maladies cardiovasculaires, il y a l'athérosclérose qui est une maladie inflammatoire chronique progressive caractérisée par un épaississement et un durcissement des artères provoquant ainsi une réduction de leur diamètre. La première étape de cette maladie est caractérisée par la présence de dysfonctionnements des cellules endothéliales qui, via l'activation de molécules d'adhésion et l'expression des chimiokines, recrutent les

monocytes circulants et les familles de lymphocytes CD4/CD8 dans l'intima. La dysfonction endothéliale peut être induite par les oxLDL (Zhang *et al.*, 2006).

Le diabète est un facteur majeur du développement des maladies coronariennes, de morbidité et de mortalité. Les personnes adultes diabétiques courent 2 à 4 fois plus de risque de développer des maladies cardiovasculaires et 60% de risque de mortalité précoce par rapport aux personnes non diabétiques (Lundberg *et al.*, 1997; Lotufo *et al.*, 2001). Les individus diabétiques ont fréquemment un faible taux de cholestérol associé aux HDL et un taux élevé de triglycérides plasmatiques (Betteridge, 1999). Il est bien connu que le taux de cholestérol associé aux HDL plasmatiques est inversement corrélé avec le risque de développer de l'athérosclérose ou une des maladies cardiovasculaires.

Pour diminuer les risques de développer l'athérosclérose, les personnes à risque, dont les diabétiques prennent des médicaments hypolipidémiques, tels les statines, permettant d'abaisser le taux de leurs lipides plasmatiques (Brouwers *et Stehouwer*, 2012). Ces statines inhibent la synthèse des lipides via l'activation de l'« adenosine monophosphate activated protein kinase » (AMPK) (Sun *et al.*, 2006) qui inhibe à son tour l'activité de l'HMG-CoA réd, enzyme limitante de la biosynthèse de cholestérol (Oliaro-Bosso *et al.*, 2009). Le traitement avec les statines altère aussi la sécrétion de l'apoB (Ballantyne *et al.*, 2008). L'inhibition de la biosynthèse et de la sécrétion du cholestérol est une cible majeure pour prévenir l'hyperlipidémie.

1.3.2 Structure de l'AMPK et son association au métabolisme énergétique

L'AMPK est une enzyme clé de la régulation du métabolisme énergétique. C'est un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité catalytique (α) et de deux sous-unités régulatrices (β et γ), chacune représentée par différentes isoformes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\gamma 3$) codées par des gènes distincts. Ces différentes isoformes permettent ainsi la formation de 12 complexes possibles ($\alpha\beta\gamma$). La prépondérance de chacun de ces complexes dépend du tissu (Cheung *et al.*, 2000).

L'AMPK a été d'abord identifiée pour ses actions inhibitrices au niveau hépatique sur l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) (Davies *et al.*, 1992) et sur l'HMG-CoA réd (Carling *et al.*, 1987), deux enzymes limitantes respectivement de la synthèse des acides gras et du

cholestérol. Les effets d'une activation de l'AMPK sur le métabolisme énergétique s'observent non seulement dans le foie mais aussi dans d'autres tissus périphériques (muscles, tissu adipeux et pancréas) et même au niveau central (hypothalamus).

Chez les mammifères, la balance énergétique se caractérise par un rapport ATP/ADP élevé (ratio 10/1). Ainsi, cette balance peut être perturbée par un facteur environnemental qui peut provoquer une chute d'ATP d'où la modification des rapports ATP/ADP et ATP/AMP par l'intervention de l'adénylate kinase. Physiologiquement, l'AMPK est activée lors de l'augmentation du ratio AMP/ATP au niveau de la cellule en réponse aux épisodes de stress énergétique comme l'absence de glucose, l'exercice physique, l'ischémie ou l'hypoxie. Une fois activée, l'AMPK participe au maintien de l'homéostasie énergétique cellulaire en contrôlant, à court terme, l'activité de certaines enzymes et à long terme, l'expression de certains gènes dont la plupart sont impliqués dans le métabolisme énergétique (Foretz *et al.*, 1998 et 2005).

Dans des conditions de faible énergie, le taux d'AMP cellulaire augmente. L'AMP active l'AMPK par activation allostérique directe et en empêchant la déphosphorylation du résidu thréonine (Thr-172) dans le domaine d'activation de la sous-unité α par la protéine phosphatase 2C α . L'AMP active aussi la kinase LKB1 (Hardie, 2004) qui active à son tour l'AMPK par phosphorylation du résidu thréonine-172 de la sous-unité α . Une fois activée, l'AMPK inhibe les voies d'utilisation de l'ATP (anabolique) tels la néoglucogenèse et la lipogenèse et active la voie de génération d'ATP (catabolique) comme la glycolyse et la β -oxydation, ce qui rétablit la balance énergétique. Au niveau du foie, l'activation de l'AMPK inhibe la lipogenèse, la synthèse de glycogène et la néoglucogenèse (Grossman *et al.*, 2006).

Des données récentes suggèrent que le rôle de l'AMPK ne se limite pas au métabolisme énergétique. Cette enzyme intervient aussi dans la régulation de la croissance et la prolifération cellulaire, dans la polarité cellulaire et dans l'autophagie (Wang *et al.*, 2009; Theodoropoulou *et al.*, 2010).

1.3.3 Produits permettant l'activation de l'AMPK

1.3.3.1 Metformine

La metformine est une biguanide largement utilisée pour le traitement de diabète de type 2 (Kahn *et al.*, 2005). L'effet systématique principal de ce produit est l'abaissement de la glycémie. Cet effet a été expliqué par la réduction de la néoglucogenèse hépatique et par l'augmentation de la captation du glucose au niveau du muscle squelettique (Hundal, 1992 ; Stumvol, 1995). Elle est connue comme un activateur de l'AMPK *in vivo* et *in vitro* (Zhou *et al.*, 2001) par le biais d'une augmentation de la phosphorylation de LKB1 (Figure 4). La metformine pénètre à l'intérieur de la cellule via l'«Organic cation transporter 1» (OCT1) (Shu *et al.*, 2007) où elle inhibe le complexe 1 de la chaîne respiratoire (Owen *et al.*, 2000), ce qui mène à un déséquilibre de la balance énergétique et par conséquent à l'activation de LKB1. L'AMPK ainsi activée augmente la sensibilité à l'insuline (Gunton *et al.*, 2003) et inhibe la production de glucose (Cusi *et al.*, 1996) via une inhibition allostérique de la fructose-1,6-biphosphatase (Miller *et al.*, 2010) (Figure 4).

1.3.3.2 Le 5-aminoimidazole-4-carboxiamide-1-β-D-ribofuranoside

L'AICAR est un analogue de l'adénosine qui est absorbé et phosphorylé par la cellule pour former un mimétique de l'AMP, ce qui permet l'augmentation du rapport AMP/ATP (Corton *et al.*, 1997) (Figure 4). Le mécanisme par lequel la cellule absorbe l'AICAR reste inconnu. Le traitement à l'AICAR de modèles de rongeurs présentant une obésité et qui sont résistants à l'insuline permet de remédier à plusieurs de leurs anomalies métaboliques (Longnus *et al.*, 2003). L'AICAR n'est pas encore utilisé comme médicament chez l'humain.

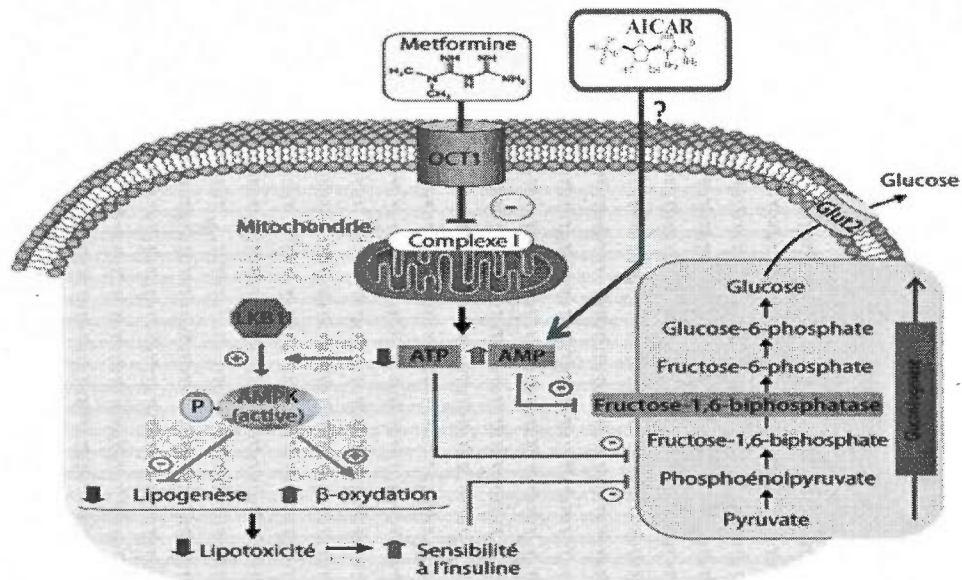


Figure 4 : Phosphorylation de l'AMPK par l'AICAR et la metformine (adapté de Viollet *et al.*, 2012). OCT1 : «Organic cation uptake transporter » L'AICAR et la metformine interviennent dans la phosphorylation de l'AMPK via la réduction du rapport ATP/AMP. Une fois activée, l'AMPK augmente la sensibilité à l'insuline et inhibe la synthèse du glucose.

Le tableau 1 met en évidence certains effets connus de l'AICAR et de la metformine sur le métabolisme des glucides et des acides gras.

Tableau 1 : Effet de l'AICAR et la metformine sur le métabolisme des acides gras et des glucides.

Médicament	Effet sur le métabolisme des acides gras et des glucides
AICAR	<ul style="list-style-type: none"> - augmentation de l'utilisation des acides gras (β-oxydation) par les myocytes cardiaques (Luiken <i>et al.</i>, 2003). - régulation de la sécrétion de l'insuline (Salt <i>et al.</i>, 1998). - réduction de la synthèse de céramide (intervenant dans la résistance à l'insuline) (Erickson <i>et al.</i>, 2012). - activation de la lipolyse via l'augmentation de l'expression de la lipase adipocytaire (Hashimoto <i>et al.</i>, 2012).
Metformine	<ul style="list-style-type: none"> - amélioration de l'hyperglycémie (Wong <i>et al.</i>, 2009). - augmentation de la sensibilité à l'insuline (Bolen <i>et al.</i>, 2007). - augmentation de la captation du glucose périphérique (Bolen <i>et al.</i>, 2007). - augmentation de l'oxydation des acides gras (Bolen <i>et al.</i>, 2007).

1.3.4 Association entre l'activité de l'AMPK et le métabolisme des lipoprotéines

Depuis quelques années, déjà, des informations suggèrent une association entre l'activité de l'AMPK et le métabolisme des lipoprotéines. Ces informations reposent sur des évidences génétiques, sur des stratégies génétiques visant à rendre l'AMPK constitutivement active et sur l'effet de médicaments tels la metformine et l'AICAR. Ainsi, Spencer-Jones et ses collaborateurs (2006) ont démontré chez l'humain une association positive forte entre un variant génétique de la sous-unité $\alpha 2$ de l'AMPK et le niveau de cholestérol associé aux LDL, alors que les souris ayant été infectées avec un adénovirus contenant l'ADN complémentaire d'une forme constitutivement active de

l'AMPK α 2 démontraient un niveau plus faible de mRNA de SREBP-1 que les souris contrôles (Foretz *et al.*, 1998).

Des résultats similaires à ceux obtenus par l'AICAR (effets sur SREBP-1) ont été observés chez la souris traitée avec la metformine (Guigas *et al.*, 2006). Bolen et ses collaborateurs (2007) ont montré que, chez des personnes atteintes de diabète de type 2, la metformine réduit de 7% le cholestérol associé aux LDL. Salpeter et ses collaborateurs (2008) ont pu remarquer dans leur étude que la metformine réduit le cholestérol associé aux LDL de 5,6% et augmente celui associé aux HDL de 5% chez des personnes diabétiques.

Le tableau 2 rapporte ce que nous savons des effets de la metformine et de l'AICAR sur différents aspects du métabolisme des lipoprotéines *in vitro* lorsque des cellules hépatiques ou musculaires sont traitées avec ces médicaments. Ces résultats suggèrent que ces produits peuvent affecter les taux de lipoprotéines, de cholestérol et de TG. Ceci est de plus supporté par des résultats non publiés de l'équipe de Dr Brissette démontrant que l'activation de l'AMPK des cellules HepG2 par l'AICAR et la metformine augmente de manière significative la dégradation des LDL, via une augmentation du niveau d'expression de rLDL. Aussi, cette équipe a démontré une augmentation de la captation sélective des EC des LDL accompagnée par une diminution du taux de SR-BI et d'une augmentation du taux de CD36. Ces modulations des taux de récepteurs et de leurs activités envers leurs ligands lipoprotéiques par ces deux médicaments, nous amène à vouloir étudier en détails leurs effets sur les récepteurs hépatiques de la souris *in vivo*.

Tableau 2: Effets de l'administration de la metformine et de l'AICAR sur des éléments du métabolisme des lipoprotéines.

	Sur des cellules hépatiques ou musculaires	Nos résultats sur les cellules HepG2 (Résultats non publiés)
Metformine	<p>↓ mRNA SREBP-1 (Guigas et <i>al.</i>, 2006) ;</p> <p>↑ expression des rVLDL et captation des TG des VLDL (Zenimaru et <i>al.</i>, 2008).</p> <p>↓ gène HMGC_oA réd (Guigas et <i>al.</i>, 2006) ;</p> <p>↓ gène rLDL (Guigas et <i>al.</i>, 2006) ;</p>	<p>↑ dégradation des LDL ;</p> <p>↑ protéine rLDL ;</p> <p>↑ protéine CD36 ;</p> <p>↑ captation sélective à partir LDL et HDL ;</p> <p>↓ protéine SR-BI.</p>
AICAR	<p>↓ activité HMGC_oA réd (Zenimaru et <i>al.</i>, 2008) ;</p> <p>↑ protéine rLDL (Wang et <i>al.</i>, 2008) ;</p> <p>↑ protéine CD36 (Habets et <i>al.</i>, 2007) ;</p> <p>↑ translocation de CD36 vers la membrane (Habets et <i>al.</i>, 2007).</p>	<p>↑ dégradation des LDL ;</p> <p>↑ protéine rLDL ;</p> <p>↑ protéine CD36 ;</p> <p>↑ captation sélective à partir des LDL et HDL ;</p> <p>↓ niveau SR-BI.</p>

Note : Les informations sont données de sorte que celles qui sont identiques apparaissent à la même ligne.

1.4 Problématique

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de décès en Amérique du Nord. Il est clair que le taux élevé de cholestérol plasmatique associé aux LDL augmente les risques de développement de l'athérosclérose. Le niveau de ces LDL dans la circulation sanguine est lié à la vitesse de synthèse de leurs précurseurs et de leur absorption par le foie. Le risque de développer des maladies cardiovasculaires est aussi plus élevé pour les individus atteints de diabète de type II. Les diabétiques sont souvent traités avec des médicaments telle la metformine qui provoque l'activation de l'AMPK, une enzyme intervenant dans la régulation de la balance énergétique (Hardie et Carling, 1997). De façon intéressante, certaines études ont aussi démontré un effet sur le métabolisme des lipoprotéines. Ainsi, des analyses sériques ont démontré une baisse de LDL chez des individus diabétiques traités à la metformine (Bolen et al., 2007). Aussi une étude menée sur des rats et sur leurs hépatocytes (Guigas *et al.*, 2006) a montré que l'activation de l'AMPK (par la metformine) diminue l'expression des gènes qui codent pour le rLDL et l'HMG-CoA réd alors que des études non publiées de l'équipe de Madame Brissette sur les cellules HepG2 ont montré que l'activation de l'AMPK augmente le niveau de rLDL et conséquemment la dégradation des LDL. L'équipe de Madame Brissette a aussi observé une diminution du taux de SR-BI accompagnée par une augmentation du taux de CD36 et une augmentation de la captation sélective des EC à partir de LDL et HDL dans la cellule HepG2 traitées avec l'AICAR ou la metformine. Des modifications du niveau de rLDL peuvent dépendre de protéines telles les SREBP (Matsuyama *et al.*, 2005), PCSK9 (Rashid *et al.*, 2005) et LXR (Repa *et al.*, 2002), alors que les taux protéiques de SR-BI peuvent être influencés par le cholestérol (Rigotti *et al.*, 1997) et la protéine adaptatrice PDZK1 (Kocher *et al.*, 2008).

L'objectif de ce travail était de déterminer si l'activation de l'AMPK par l'administration de metformine ou d'AICAR pendant 7 ou 14 jours chez la souris a un effet sur le taux rLDL, SR-BI, SR-BII et CD36, et si oui d'associer ces changements avec les protéines mentionnées ci-haut qui ont un impact sur leurs taux. Évidemment, nous voulions aussi connaître les conséquences de ces substances activant l'AMPK sur les taux de cholestérol plasmatique et hépatique ainsi que sur la clairance des LDL et HDL dans un tel modèle.

CHAPITRE II

MÉTHODOLOGIE

2.1 Méthodologie générale

Les expériences ont été faites sur des souris C57BL/6 d'environ deux mois. Les souris ont été injectées avec 0,5 mg/g de poids corporel d'AICAR ou de metformine à raison d'environ 200 µl/souris chaque jour pendant 7 ou 14 jours. L'AICAR a été dissout dans une saline physiologique (PBS) et injecté dans la cavité péritonéale des souris à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille 26G selon le protocole de Jørgensen et ses collaborateurs (2007). Les souris contrôles ont reçu 200 µl de PBS. La metformine a été dissoute dans l'eau et administrée aux souris par gavage oral à l'aide d'une seringue munie d'un tube de silicone. Les souris contrôles ont reçu 200 µl d'eau.

2.2 Prélèvement du foie et du plasma

Le lendemain après le dernier traitement, les souris ont été mises à jeun pendant une heure pour minimiser l'effet de la diète sur les résultats. Elles étaient anesthésiées par l'isoflurane et un prélèvement sanguin a été fait par ponction cardiaque sans incision à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille 26G. Le sang récupéré de chaque souris a été centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C pour récupérer le plasma. Le taux de cholestérol plasmatique a été quantifié par un kit commercial (Wako, Richmond, Va). Le foie a été récupéré. Une première partie du foie a été utilisée pour l'extraction des lipides hépatiques selon le protocole de Folch et ses collaborateurs (1957). Ainsi, 0,5 g de foie de souris traitées avec l'AICAR ou la metformine pendant 14 jours a été homogénéisé dans un mélange chloroforme-méthanol (2:1) à l'aide d'un homogénéisateur polytron à la vitesse maximale pendant 20 secondes, puis agité pendant 15 minutes à la température ambiante. Une centrifugation à 10 500 g pendant 10 minutes à la température ambiante a permis de récupérer le surnageant contenant les lipides auquel a été ajouté 0,2 volume d'une solution de NaCl à 0,9%. Le mélange a ensuite été homogénéisé vigoureusement à l'aide d'un appareil vortex à la vitesse maximale pendant 1 minute. Pour récupérer la phase inférieure contenant les lipides, une centrifugation à 1 500 g, à la température

ambiante pendant 15 minutes, a été faite. Cent μl de cette phase a été évaporé sous l'azote et le culot contenant les lipides a été resuspendu dans 50 μl d'isopropanol. Les quantifications des taux de TG et de cholestérol ont été faites respectivement par des kits commerciaux (Sigma, Aldrich et Wako, Richmond, Va), reposant sur des méthodes enzymatiques/colorimétriques. La seconde partie du foie a servi pour la mesure du niveau de certaines protéines par la technique de «Western blot». Une troisième partie a été utilisée pour l'extraction des ARNm afin de mesurer le taux d'expression de certains gènes.

2.3 Quantification des niveaux de cholestérol de LDL et HDL plasmatiques

Pour quantifier le taux de cholestérol de chacune des fractions (LDL et HDL), une précipitation des LDL du plasma a été faite par du PEG 6000 (polyéthylène glycol) selon le protocole modifié d'Asztalos et ses collaborateurs (2005). Ainsi, un volume de 50 μl du PEG 6000 (20% dans du tampon glycine à 0,2 M, pH 7,4) a été additionné à 50 μl du plasma issu de chaque souris. Une centrifugation à 2 000 g de 15 minutes à 4°C a permis de précipiter les LDL; le surnageant contenait donc les HDL. Le culot ainsi récupéré a été resuspendu dans 12,5 μl d'une solution de NaCl (0,45 M) et le taux de cholestérol associé aux LDL (CHOL-LDL) a été quantifié par un kit commercial (Wako, Richmond, Va). Le taux de CHOL-HDL a été déduit par la soustraction de la quantité du CHOL-LDL à la quantité de cholestérol total (cholestérol total = CHOL-HDL + CHOL-LDL).

2.4 Quantification des niveaux de certaines protéines hépatiques

L'extraction des protéines totales du foie a été faite à l'aide du tampon RIPA ou «radioimmunoprecipitation assay» (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% sodium déoxycholate, 1% Triton X 100 et inhibiteurs de phosphatase: 100 mM pyrophosphate de sodium, 1 M de fluorure de sodium, 100 mM orthovanadate de sodium, 0,1 M de phénylméthylsulfonyl (PMSF) et 4 mM de cocktail d'inhibiteurs de protéases) comme indiqué par Ngoka (2008). Cent mg de foie a été broyé dans 1 ml du tampon RIPA par le polytron utilisé à la vitesse maximale, trois fois pendant 10 secondes. L'homogénat de foie a été ensuite centrifugé à 9 400 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant

correspondant aux protéines a été dosé suivant la méthode de Lowry et ses collaborateurs (1951). Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de 8% en présence de sodium dodécyle sulfate (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) et transférées sur une membrane de nitrocellulose selon la méthode de Burnette (1981). Le blocage de membranes a été fait dans du TBS-T (20 mM Tris à pH 7,6 contenant 137 mM de NaCl et 0,1% de Tween-20) contenant 5% de lait en poudre sous agitation pendant 2 heures à la température ambiante. La détection spécifique des protéines et récepteurs a été faite par des anticorps primaires (AC1) polyclonaux spécifiques qui ont été par la suite exposés à un anticorps secondaire (AC2) anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase. Les deux anticorps ont été dilués dans du TBS-T selon la protéine ou le récepteur. Ces dilutions apparaissent au Tableau 3. Les protéines SR-BI, SR-BII et SREPB-2 ont été hybridées pendant 90 minutes à 37°C avec l'AC1 puis dans les mêmes conditions avec l'AC2. Les autres protéines (CD36, PDZK1, LXR α , rLDL, ABCA1 et HNF4 α) ont été incubées avec l'AC1 pendant une nuit à 4°C et après avec l'AC2 pendant 90 minutes à 37°C. La révélation a été faite par un kit de chimiluminescence (Millipore) pendant 5 minutes. L'exposition a été faite sur un film de chimiluminescence «HyBlot CLTM». L'AC2 a été acheté de BD Biosciences. Les fournisseurs des autres AC apparaissent dans le tableau 3.

Tableau 3 : Dilutions de l'AC1 et l'AC2 utilisées pour la détection de certains récepteurs et protéines

Protéine ou récepteur	Dilution de l'AC1/ Compagnie	Dilution de l'AC2
SR-BI	1/5 000 (<i>Novus Biologicals</i>)	1/5 000
SR-BII	1/3 000 (<i>Novus Biologicals</i>)	1/3 000
CD36	1/2 000 (<i>Novus Biologicals</i>)	1/10 000
rLDL	1/500 (<i>ABCAM</i>)	1/2 500
PDZK1	1/2 000 (<i>Novus Biologicals</i>)	1/6 000
LXR α	1/500 (<i>ABCAM</i>)	1/10 000
SREBP2	1/250 (<i>BD Biosciences</i>)	1/10 000
ABCA1	1/500 (<i>Novus Biologicals</i>)	1/2 500
HNF4 α	1/500 (<i>Novus Biologicals</i>)	1/2 500

2.5 Quantification des niveaux des ARNm hépatiques

L'ARN total a été extrait à partir du foie par le réactif TRIzol comme suggéré par la compagnie «*Invitrogen*». L'ADN complémentaire (cDNA) a été synthétisé à partir de 2 µg d'ARNm en utilisant le kit Omniscript de Qiagen avec des oligo-dT. Le produit de la transcription réverse a servi pour la PCR semi-quantitative en temps réel (BioRad) en utilisant le SYBR green. Les oligomères spécifiques présentés dans le tableau 4 ont été utilisés. L'hybridation avec les différents oligomères a été faite à 60°C pendant 45 secondes. Le gène de normalisation utilisé était le GAPDH selon Cantz et ses collaborateurs (2003).

Tableau 4 : Oligomères spécifiques des différentes protéines

Protéine	Oligomères	
	Sens	Antisens
GAPDH (Cantz <i>et al.</i> , 2003)	5' -CCTGCACCACCAA CTGCTTA-3'	3' -TCATGAGCCCTT CCACAATG-5'
rLDL (Yang <i>et al.</i> , 2001)	5' -AGGTGTGGGCTC CATCGCCTA-3'	5' -AGTCAGTCCAGT ACATGAAGCCA-3'
SR-BI (Srivastava, 2003)	5' -TGAAGGTGGTCT TCAAGAGCAGTCCT-3'	5' GATTGGGAAGAC AATAGCAGGCATGC- 3'
PCSK9 (Costet <i>et al.</i> , 2006)	5' -CACCTTTGGGTC GAGTGCTGAG-3'	5' -CGCTGTTGAAGTC GGTGATG- 3'

2.6 Isolement et marquage radioactif des LDL et HDL

L'isolement des LDL et HDL a été fait par ultracentrifugation du plasma normolipidémique humain (Bioreclamation) suivant les principes du protocole de Hatch (1968). Ainsi, avant de commencer l'isolement des lipoprotéines, le plasma a été additionné de 0,01% d'éthylène diamine tétraacétate (EDTA), de 0,02% d'azoture de sodium, de 10 mM de PMSF et de 10 mM de Trolox. L'isolement des LDL a débuté par

l'ajout de bromure de sodium (NaBr) au plasma humain pour amener sa densité à 1,025 g/ml, puis le plasma a été centrifugé à $2,3 \times 10^6$ g pendant 16 heures. Un réajustement du sousnageant à 1,063 g/ml a été fait en ajoutant du NaBr et une dernière ultracentrifugation à $2,3 \times 10^6$ g pendant 16 heures a été faite pour récupérer les LDL à la surface du tube. Pour isoler les HDL, un réajustement de la densité du plasma à 1,125 g/ml a été fait en ajoutant du NaBr. La procédure d'isolement s'est poursuivie par une ultracentrifugation à 3×10^6 g pendant 22 heures. La phase inférieure ainsi récupérée a été réajustée à 1,210 g/ml puis centrifugée à $4,6 \times 10^6$ g pendant 22 heures. La phase supérieure ainsi récupérée correspondait aux HDL. Toutes les ultracentrifugations ont été faites à 16°C. Les LDL et HDL ainsi isolées ont été dialysées dans du tampon salin (TBS) (10 mM Tris à pH 7,4 contenant 150 mM de NaCl et 0,02% de NaN_3) pour éliminer l'excès de sel dans les préparations.

Les LDL et les HDL ont été marquées à l'iode-125 par une modification (Langer *et al.*, 1972) de la méthode de monochlorure d'iode (McFarlane, 1948). Un millicurie de Na^{125}I a été utilisé pour marquer 2,5 mg de lipoprotéines en présence de 30 nmole de monochlorure d'iode dans 0,5 M glycine-NaOH (pH 10). L'iode libre a été éliminé par une filtration sur gel de Sephadex G-25 suivie d'une dialyse dans du TBS pendant une nuit. Le marquage de ces lipoprotéines par le ^3H -cholestérol-éther (CET) a été réalisé comme décrit par Roberts et ses collaborateurs (1985). Ainsi, 25 μCi de ^3H -CET ont été utilisés pour marquer 1 mg de LDL ou de HDL auxquelles ont été ajouté 3 ml de sérum délipidé contenant de la CETP («cholesterol ester transfer protein») qui permet l'incorporation de ^3H -CET dans les lipoprotéines. Une incubation à 4°C pendant 30 minutes a été faite avant de commencer l'isolement selon le protocole de Hatch (1968) décrit précédemment. L'utilisation d'éther de cholestérol tritié, au lieu d'ester de cholestérol tritié, pour marquer les lipoprotéines est nécessaire du fait que les lysosomes des cellules qui captent les esters de cholestérol vont les hydrolyser au cours du temps et ils peuvent se retrouver dans la circulation sanguine sous forme de cholestérol libre tritié contrairement aux éthers de cholestérol (tritiés) qui restent dans les lysosomes. Ceci permettra d'avoir les valeurs exactes des LDL et HDL marquées restant dans la circulation sanguine donc non captées par le foie.

2.7 Clairance *in vivo* des lipoprotéines marquées

Des souris traitées avec l'AICAR pendant 14 jours et des souris contrôles ont été mises à jeun pendant 25 heures (La mise à jeun a débuté une heure avant le début des expériences). La queue de chaque souris a été trempée dans de l'eau chaude et injectée à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille 26G dans la veine caudale avec 20 µg de LDL ou HDL marquées soit à l'iode-125 pour suivre les protéines, ou avec du ^3H -CEt pour suivre les lipides dans la circulation sanguine. L'injection a été réalisée avec une solution stérile (NaCl 0,1M) de volume inférieur à 0,2 ml représentant moins de 5 millions de cpm en radioactivité, soit un peu plus de 2 µCi. À 0, 0,25, 0,5, 1, 3, 8 et 24 heures (après les injections), 20 à 25 µl de sang ont été prélevés, sans anesthésie, par la veine saphène. Une centrifugation des échantillons de sang à 7 500g pendant 15 minutes à 4°C a permis de récupérer le plasma et la radioactivité a été mesurée. La radioactivité β des LDL et HDL marquées en ^3H -CEt a été mesurée directement à partir du plasma par scintillation dans un compteur Wallach-Fischer. La fraction restante de ^{125}I -LDL ou ^{125}I -HDL demeurant dans le plasma, donc non captée par le foie, a été évaluée après précipitation des fractions à l'acide trichloracétique (TCA). Ainsi, les peptides liés à ^{125}I qui sont retournés dans la circulation sanguine suite à la dégradation lysosomale des lipoprotéines marquées à l'iode-125 ne seront pas précipités et cela permet de mesurer la quantité exacte de ^{125}I -LDL et ^{125}I -HDL intactes demeurées dans le plasma. La procédure de la précipitation à l'acide trichloracétique est la suivante : 10 à 15 µl de plasma ont été complétés à 125 µl avec d'albumine de sérum bovin (BSA) à 2% auxquels ont été ajoutés 125 µl de TCA à 30%. Après une incubation à 4°C pendant 24 heures, une centrifugation à 3 750 g pendant 15 minutes à 4°C a été faite. Le culot a été resuspendu dans 250 µl de TCA à 15% et centrifugé à 3 750 g à 4°C pendant 15 min. Le culot a été solubilisé dans 750 µl de NaOH à 0,2 N puis transféré dans un tube à compteur γ. La radioactivité γ a été ensuite comptée par un appareil Cobra. Les courbes de clairance des lipoprotéines ont été établies à partir des mesures de la radioactivité β et γ. Elles ont été analysées par le taux de catabolisme fractionnel du plasma (FCR : «fractional catabolic rate») en utilisant deux compartiments selon le modèle de Matthews (1957). Au total, 20 souris traitées avec

l'AICAR et 20 souris contrôles ont été utilisées à raison de 5 souris par type de lipoprotéine marquée injectée.

2.8 Étude statistique

L'analyse statistique des données a été faite par le test t de *Student*. La différence est jugée significative à $p < 0,05$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Comme test préliminaire, des souris C57BL/6 ont été injectées (comme indiqué dans la partie méthodologie) avec 0,44 mg/g ou 0,22 mg/g de poids corporel d'AICAR, 3 fois par semaine, pendant 4 semaines, ou de metformine pendant 5 jours consécutifs selon les conditions, respectivement, de Jørgensen et ses collaborateurs (2007) et de Kim et ses collaborateurs (2008). Ces études avaient respectivement trouvé que de tels traitements provoquaient une augmentation de l'activité de l'AMPK α 2 et une inhibition de la néoglucogenèse hépatique. Ces conditions ne se sont pas soldées en changements lipidiques ou en modifications des taux de récepteurs. Une recherche plus poussée de la littérature (tableaux 5 et 6) a été faite afin de trouver des conditions utilisées dans d'autres études. Il est à noter qu'aucune étude, mentionnées, n'a investigué les paramètres associés au métabolisme des lipoprotéines. Les tableaux comportent donc les résultats de travaux en guise de démonstration de l'efficacité de leurs traitements. Les informations données au tableau 5 nous ont permis de conclure que les plus importants effets avaient été obtenus avec une injection de 0,5 mg/g de poids corporel d'AICAR pendant une durée qui varie de 7 à 35 jours. Song et ses collaborateurs (2002) avaient traité des souris avec 1 mg/g de poids corporel d'AICAR par injection sous-cutanée chaque jour pendant 7 jours et ils avaient remarqué une diminution de la glycémie chez les souris obèses. Comme test préliminaire, nous avons essayé cette même concentration, mais les souris n'ont pas survécu. Pour cela, nous avons décidé de diminuer la concentration d'AICAR à 0,5 mg/g de poids corporel et nous avons gardé la même durée d'injection, soit 7 jours. Aussi, puisque la souris peut supporter un temps d'injection plus long (Buzzai *et al.*, 2007), nous avons aussi injecté un deuxième groupe de souris avec 0,5 mg/g de poids corporel d'AICAR pendant 14 jours. Badole et Bodhankar (2008) ont traité des souris avec 0,5 mg/g de poids corporel de metformine par gavage pendant 14 jours, ce qui a favorisé une diminution du taux de glucose sanguin (Tableau 6). En se basant sur ces données, en plus de l'analyse du tableau 8, nous avons choisi de traiter les souris, par gavage, avec 0,5 mg de metformine/g de poids corporel pendant 7 et 14 jours (comme le traitement avec l'AICAR).

Tableau 5 : Effet de différentes doses d'AICAR sur le métabolisme lipidique et glucidique de la souris.

Dose administrée	Résultats
Leick <i>et al.</i> , 2010: 0,5 mg/g par injection intrapéritonéale.	Diminution de la concentration du glucose plasmatique et phosphorylation de l'AMPK et de l'Acétyl-CoA carboxylase (ACC) au niveau des muscles squelettiques une heure après l'injection.
Giri <i>et al.</i> , 2006: 0,5 mg/g par injection intrapéritonéale, 3 fois par semaine pendant 6 semaines	Inhibition de la différenciation des adipocytes; Blocage de gain de poids et amélioration de la tolérance au glucose chez les souris obèses
Buzzai <i>et al.</i> , 2007: 0,5 mg/g par injection intrapéritonéale chaque jour pendant 35 jours	Réduction du volume tumoral de 50%
Halseth <i>et al.</i> , 2002: 0,5 mg/g par injection sous cutanée 2 fois par jour pendant 8 jours	Diminution de la glycémie 18 heures après l'administration de l'AICAR et augmentation du taux de triglycérides
Song <i>et al.</i> , 2002: 1 mg/g par injection sous cutanée chaque jour pendant 7 jours	Diminution de la glycémie chez les souris obèses

Tableau 6 : Effet de différentes doses de metformine sur le métabolisme lipidique et glucidique de la souris.

Dose administrée	Résultats
Tomimoto <i>et al.</i> , 2008: 0,25 mg/g par injection intrapéritonéale 1 fois par jour pendant 10 semaines	Réduit le nombre de polypes intestinaux dont le diamètre est supérieur à 1 mm
Shore <i>et al.</i> , 2008: 0,3 mg/g par gavage 1 fois par jour pendant 2 semaines	Diminution de la glycémie à jeun chez les souris obèses
Algire <i>et al.</i> , 2008: 50 µg/g dans l'eau pendant 8 semaines	Augmentation de l'activité des récepteurs d'insuline et de la phosphorylation de l'AMPK
Heishi <i>et al.</i> , 2006: 0,4 mg/g par gavage 1 seule fois et effet mesuré 2 heures après	Réduction de l'expression des gènes qui codent pour la glucose-6-phosphatase et réduction du glucose sanguin
Maida <i>et al.</i> , 2010: 0,3 mg/g par injection intrapéritonéale 1 fois par jour pendant 2 jours suivi d'une administration par gavage de 0,075 mg/g 4 heures avant l'euthanasie	Augmentation de la synthèse de l'expression de Glp1r «glucagon-like peptide 1 receptor » et autres récepteurs insulinothropes
Badole et Bodhankar, 2008: 0,5 mg/g par gavage pendant 2 semaines	Réduction du taux de glucose sanguin chez les souris diabétiques

3.1 Effets de l'AICAR et de la metformine sur les taux de cholestérol plasmatique

La figure 5 (A) démontre une diminution significative du cholestérol plasmatique total. Cette diminution est de 17,5% chez les souris traitées avec l'AICAR pendant 14 jours et de 10,5% chez celles traitées avec la metformine pendant 14 jours (tableau 7) comparativement au groupe de souris contrôles. Le traitement avec ces deux produits pendant 7 jours n'a pas d'effet sur le taux de cholestérol total. Pour vérifier si cette diminution est due à une diminution du cholestérol associé aux HDL ou aux LDL, la

méthode de précipitation des LDL au PEG 6000 a été utilisée. Une augmentation significative du cholestérol associé aux LDL est observée chez les souris traitées avec l'AICAR pendant 7 et 14 jours ou la metformine pendant 7 et 14 jours (Figure 5 (B)); respectivement, cette augmentation est de 47,7, 26,3, 46,8 et 18,3% (tableau 7). L'observation de la figure 5 (C) démontre qu'après 14 jours du traitement, le taux cholestérol associé aux HDL diminue de 44,8% par rapport au traitement à l'AICAR pendant 7 jours et de 60,8 % après 14 jours de traitement à la metformine par rapport au traitement 7 jours. Le taux cholestérol associé aux HDL diminue significativement de 21,1 et 26,2% chez les souris traitées avec l'AICAR pendant 14 jours et 7 jours, respectivement. Le traitement avec la metformine ne semble pas affecter le taux du cholestérol associé aux HDL (Figure 5 (C) et tableau 7. L'observation de l'ensemble des résultats (figure 5 et tableau 7) démontre que le traitement avec l'AICAR pendant 14 jours diminue davantage le cholestérol total par rapport aux autres traitements. Ainsi ce même traitement provoque une diminution significative de cholestérol associé aux HDL plus faible par rapport au traitement avec l'AICAR pendant 7 jours.

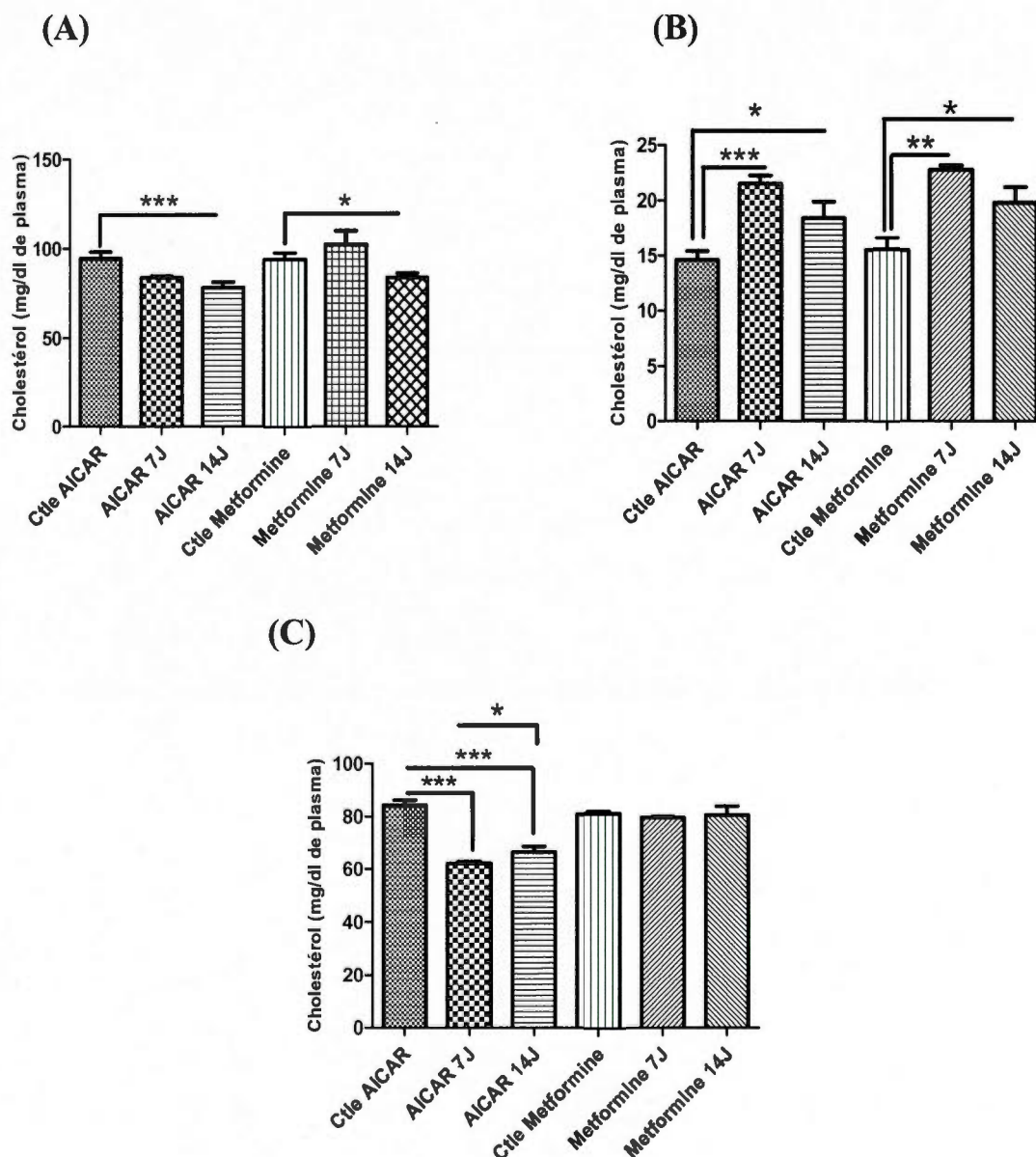


Figure 5 : Effet de l'AICAR et de la metformine sur le taux de cholestérol-plasmatique. (A) Cholestérol plasmatique total; (B) Cholestérol associé aux LDL; (C) Cholestérol associé aux HDL. Les souris ont reçu soit l'AICAR (ou du PBS pour les souris contrôles) par injection intrapéritonéale ou la metformine (ou de l'eau pour les souris contrôles) par gavage pendant 7 ou 14 jours. Le sang a été récupéré et centrifugé à 4°C, à 10 000 g, pendant 10 minutes. Le dosage de cholestérol total a été fait directement sur 10 μ l du plasma. Les LDL ont été précipitées avec du PEG 6000 et leur cholestérol a été dosé. Le cholestérol associé aux HDL a été déduit de la règle suivante : Cholestérol total = Cholestérol-HDL + Cholestérol-LDL. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne \pm SEM d'un nombre de répétition allant de 7 à 18. Les analyses statistiques ont été faites par le test *t* de Student où la différence est jugée significative à $p < 0,05$.

Tableau 7 : Récapitulatif de l'effet de l'AICAR et de la metformine sur le taux de cholestérol plasmatique en termes de pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport aux résultats des souris contrôles. Les valeurs représentées entre parenthèses indiquent le nombre de répétitions. Les analyses statistiques ont été faites par le test *t* de *Student* où la différence est jugée significative à $p < 0,05$. N.S. veut dire non significatif.

	AICAR 7 jours	AICAR 14 jours	Metformine 7 jours	Metformine 14 jours
Cholestérol total	-11,6% (7) N.S.	-17,5% (21) $p < 0,001$	+8,9% (4) N.S.	-10,5% (19) $p < 0,05$
Cholestérol-LDL	+47,7% (7) $p < 0,005$	+26,3% (17) $p < 0,05$	+46,8% (4) $p < 0,01$	+18,3% (18) $p < 0,05$
Cholestérol-HDL	-26,2% (7) $p < 0,0001$	-21,1% (17) $p < 0,0001$	-1,5% (4) N.S.	+0,3% (18) N.S.

3.2 Effets de l'AICAR et de la metformine sur les taux de récepteurs et protéines impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines

La figure 6 démontre une diminution du taux de SR-BI chez les souris traitées avec l'AICAR ou la metformine, pendant 7 jours ou 14 jours. Cette diminution est plus importante avec le traitement à l'AICAR pendant 14 jours. Ce même traitement favorise l'augmentation du taux de SR-BII et la diminution de celui de PDZK1. Le traitement avec l'AICAR ou la metformine semble ne pas affecter l'expression du CD36. Nous pouvons voir, sur la même figure, une augmentation du taux du rLDL surtout avec l'AICAR pendant 14 jours corrélée à une augmentation avec tous les traitements de son régulateur transcriptionnel SREBP-2. Le taux de LXR α augmente faiblement avec les deux produits. Cette augmentation semble ne pas être affectée par le temps de traitement.

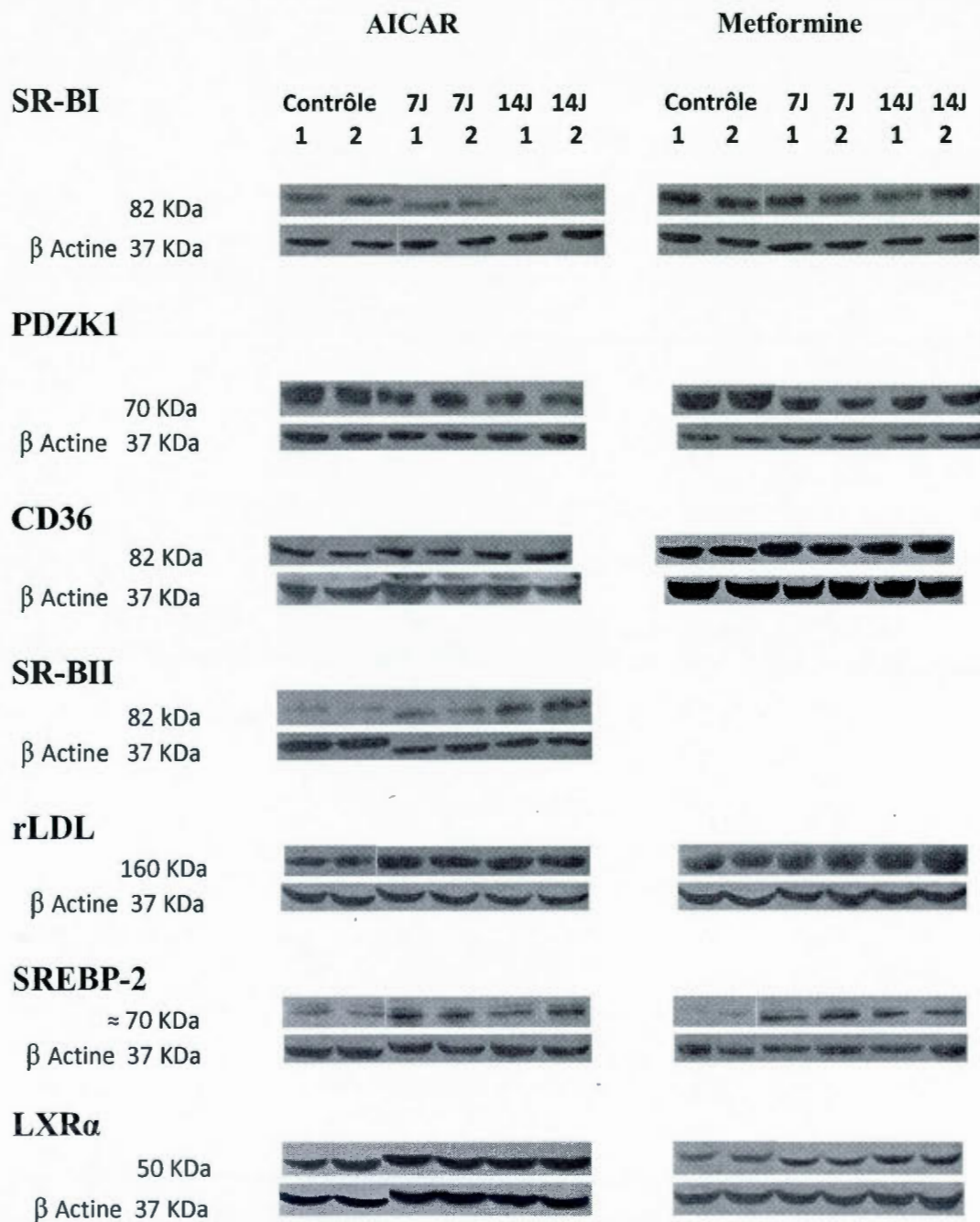


Figure 6 : Niveaux hépatiques des protéines PDZK1, SREBP-2(forme mature), LXR α et des récepteurs SR-BI, SR-BII, rLDL et CD36. Les souris ont reçu soit l'AICAR (ou du PBS pour les souris contrôles) par injection intrapéritoniale ou la metformine (ou de l'eau pour les souris contrôles) par gavage pendant 7 ou 14 jours. Les protéines ont été extraites, séparées sur gel de polyacrylamide, transférées sur membrane pour révélation avec des anticorps spécifiques tel que décrit dans la section Matériel et méthodes.

3.3 Effets de l'AICAR et de la metformine sur les taux des ARNm de SR-BI, du rLDL et du PCSK9

Puisque les taux protéiques de rLDL et de SR-BI se sont vus changés par les traitements avec l'AICAR et la metformine, nous avons décidé de quantifier leurs ARNm pour savoir s'ils correspondent avec leurs taux protéiques ou, dans le cas contraire, détecter l'existence de régulations post-transcriptionnelles. La figure 7 (A) démontre une diminution de l'expression du gène qui code pour le SR-BI. Au niveau des souris traitées avec l'AICAR pendant 7 jours, cette diminution est de 61,4 % (Tableau 8). Le gène qui code pour le rLDL augmente de 46,6% au niveau des souris traitées avec l'AICAR pendant 14 jours (Figure 7 (B) et tableau 8). Ces variations de l'expression des gènes de SR-BI et du rLDL corrélerent donc avec leurs taux protéiques (Figure 6). La figure 6 démontre une faible augmentation du taux de rLDL, ce qui nous a poussé à faire une quantification de l'ARNm de PCSK9, un des régulateurs du rLDL favorisant sa dégradation lysosomale (Ni *et al.*, 2010). La figure 7 (C) démontre une augmentation de l'ARNm de PCSK9 chez les souris traitées avec l'AICAR pendant 14 jours. Cette augmentation est de 32% (Tableau 8).

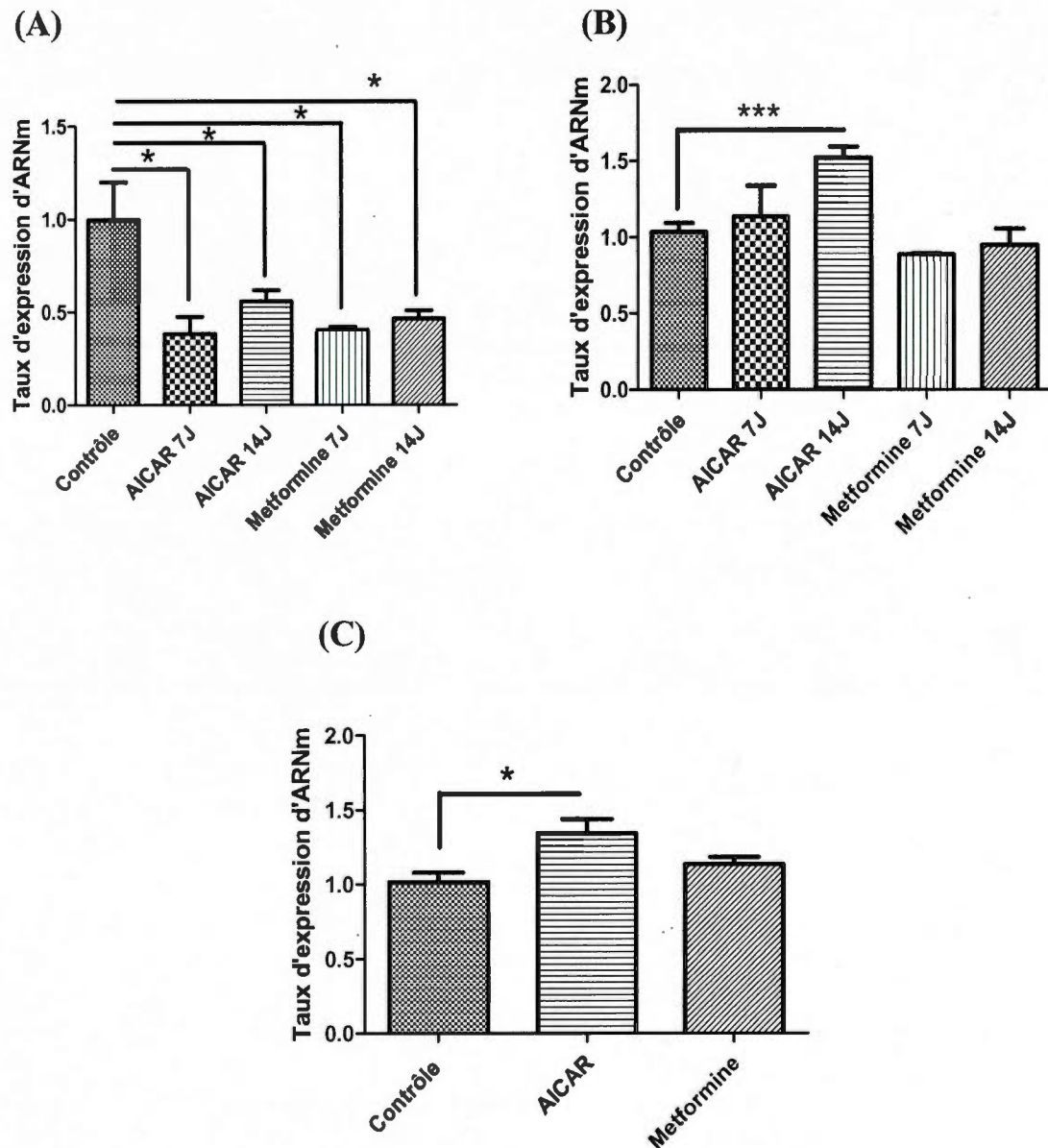


Figure 7 : Quantification de l'ARNm de SR-BI, du rLDL et de PCSK9. (A) Taux d'expression d'ARNm de SR-BI; (B) Taux d'expression d'ARNm du rLDL; (C) Taux d'expression d'ARNm de PCSK9. L'ARN a été extrait à partir de foie de souris (contrôles ou traitées avec l'AICAR ou la metformine pendant 14 jours) par le réactif TRIzol. L'ADnc a été synthétisé en utilisant le kit Omniscript de Qiagen avec l'oligo-dT. La PCR semi-quantitative en temps réel a été réalisée en utilisant des oligomères spécifiques pour chaque gène. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne \pm SEM d'un nombre de répétition allant de 5 à 10. Les analyses statistiques ont été faites par le test *t* de Student. La différence est significative à $p < 0,05$.

Tableau 8 : Récapitulatif de l'effet de l'AICAR et de la metformine sur le taux d'ARNm de SR-BI, du rLDL et de PCSK9 en termes de pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport aux résultats des souris contrôles. Les valeurs représentées entre parenthèses indiquent le nombre de répétitions. Les analyses statistiques ont été faites par le test *t* de *Student*. La différence est significative à $p < 0,05$. N.S. veut dire non significatif et N.M. signifie non mesuré.

ARNm	AICAR 7J	AICAR 14J	Metformine 7J	Metformine 14J
SR-BI	-61,4% (10) p<0,05	-44,1% (10) p<0,05	-59,4% (10) p<0,05	-53,3% (10) p<0,05
rLDL	+9,6% (10) N.S.	+46,6% (10) p<0,001	-14% (10) N.S.	-8,4% (10) N.S.
PCSK9	N.M.	+32% (8) p<0,05	N.M.	+11,6 % (5)

3.4 Effet de l'AMPK sur les protéines ABCA1 et HNF4 α

La diminution de SR-BI (Figure 6) devrait favoriser l'augmentation du taux de cholestérol plasmatique associé aux HDL. Or ce taux a diminué. Nous avons pensé à un effet d'AMPK sur le taux de production des particules HDL. Pour cela, nous avons procédé à la quantification de deux protéines intervenant dans la synthèse et la maturation de la particule HDL qui sont l'ABCA1 et la HNF4 α . Chan et ses collaborateurs (1993) avaient démontré que la protéine HNF4 α augmente l'expression du gène qui code pour l'apoA-I, une des apolipoprotéines les plus abondantes au niveau des HDL. Or, la phosphorylation de cette protéine, par le biais de l'AMPK, la rend moins active (Hong *et al.*, 2003). La protéine ABCA1 est un transporteur clé du cholestérol vers les HDL (Oram *et al.*, 2000), ce qui favorise la maturation de ces particules et par conséquent protège contre l'athérosclérose via l'augmentation du transport inverse du cholestérol (Cuchel et Rader, 2006). La figure 8 démontre une importante diminution de l'expression de l'ABCA1 avec les deux traitements (AICAR et metformine). L'HNF4 α diminue seulement au niveau des souris traitées avec l'AICAR pendant 14 jours. Nous pouvons conclure que le traitement AICAR engendre la diminution des protéines ABCA1 et HNF4 α (expériences faites deux fois).

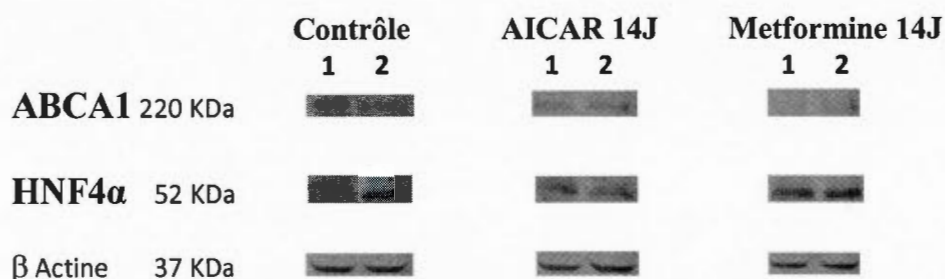


Figure 8 : Niveaux hépatiques des protéines ABCA1 et HNF4 α intervenant dans le métabolisme des HDL. Les souris ont reçu soit l'AICAR (ou du PBS pour les souris contrôles) par injection intrapéritoniale ou la metformine (ou de l'eau pour les souris contrôles) par gavage pendant 14 jours. Les protéines ont été extraites, séparées sur gel de polyacrylamide, transférées sur membrane pour révélation avec des anticorps spécifiques tel que décrit dans la section Matériel et méthodes.

3.5 Effets de l'AICAR et de la metformine sur les taux de cholestérol hépatique et des triglycérides

Selon les résultats précédents, généralement, le traitement avec l'AICAR ou la metformine pendant 14 jours a permis d'observer les effets les plus importants. Pour cela, nous avons utilisé ces deux conditions pour étudier l'impact de la phosphorylation de l'AMPK sur le taux de lipides hépatiques. La figure 9 (A) démontre une diminution significative du cholestérol hépatique de 13,4% au niveau des souris traitées avec l'AICAR pendant 14 jours et de 16,1% pour celles traitées avec la metformine pendant 14 jours (Tableau 9). Aussi, une diminution importante des triglycérides hépatiques de 26% est observée au niveau du traitement AICAR pendant 14 jours. La metformine semble ne pas avoir d'effet sur les triglycérides hépatiques (figure 9 (B) et tableau 9). L'administration de l'AICAR pendant 14 jours semble être le meilleur traitement favorisant à la fois la diminution des triglycérides et du cholestérol hépatiques.

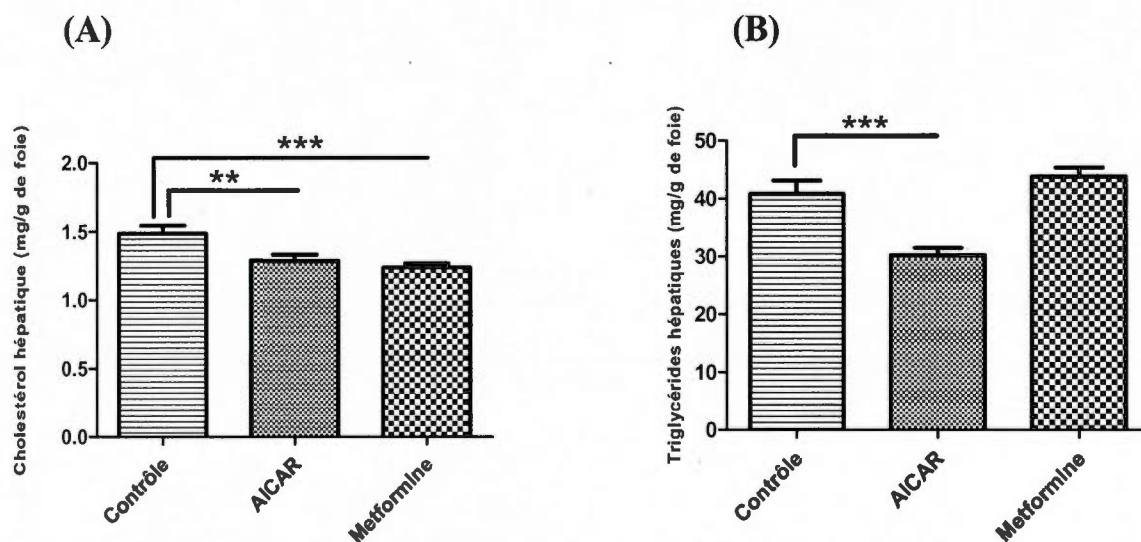


Figure 9 : Effet du traitement avec l'AICAR ou la metformine sur les taux hépatiques de cholestérol et de triglycérides. (A) Cholestérol hépatique; (B) Triglycérides hépatiques. Les souris ont reçu soit l'AICAR (ou PBS pour les souris contrôles) par injection intrapéritonéale ou la metformine (ou l'eau pour les souris contrôles) par gavage pendant 14 jours. Les lipides hépatiques ont été extraits à partir du foie selon la méthode de Folch et ses collaborateurs (1957). Le cholestérol et les triglycérides hépatiques ont été dosés par les kits commerciaux (Wako et Sigma respectivement). Les valeurs représentées correspondent à la moyenne \pm SEM de 11 ou 12 répétitions. Les analyses statistiques ont été faites par le test *t* de Student où la différence est significative à $p < 0,05$.

Tableau 9 : Récapitulatif de l'effet du traitement avec l'AICAR ou la metformine sur les taux hépatiques de cholestérol et de triglycérides en termes de pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport aux résultats des souris contrôles. Les valeurs représentées entre parenthèses indiquent le nombre de répétitions. Les analyses statistiques ont été faites par le test *t* de Student où la différence est significative à $p < 0,05$. N.S. veut dire non significatif.

Lipides hépatiques	AICAR 14 jours	Metformine 14 jours
Cholestérol	-13,4% (12) $p < 0,05$	-16,1% (12) $p < 0,001$
Triglycérides	-26% (11) $p < 0,0005$	+7,2% (11) N.S.

3.6 Clairance *in vivo* des LDL et des HDL marquées

Il est clair que la clairance des LDL se fait par rLDL par le biais d'un processus impliquant l'endocytose et la dégradation complète de la LDL (Brown et Goldstein, 1986). En revanche, la clairance du cholestérol associé aux HDL semble être accomplie par la voie de captation sélective qui extrait les EC des lipoprotéines sans dégrader leurs apolipoprotéines (Acton *et al.*, 1996). Bien que cette captation sélective est habituellement associée aux HDL, des études avaient démontré que cette voie peut aussi agir sur les LDL (Brissette *et al.*, 1996). Rhainds et ses collaborateurs (2003) avaient démontré que le SR-BI était responsable de 85% de la captation sélective des EC des HDL et des LDL. Ainsi, les variations des taux de SR-BI, du rLDL (Figure 6) et du cholestérol associé aux LDL et celui des HDL (Figure 5 (B) et (C) respectivement) suite aux traitements, nous a amené à étudier la clairance des EC des HDL et des LDL.

La comparaison entre la vitesse de disparition des ^{125}I -lipoprotéines et celle des ^3H -CET-lipoprotéines au niveau des souris contrôles ou traitées avec l'AICAR démontre l'existence de la captation sélective des EC (Figure 10 (A) et(B)) et figure 11 (A) et (B)), car les lipides disparaissent plus rapidement que les protéines. L'AICAR diminue significativement la clairance des ^{125}I -HDL (-19,3%) et par conséquent réduit la captation sélective des EC des HDL (Tableau 10). Ainsi, au niveau des souris traitées avec l'AICAR, les ^3H -CET-HDL et ^{125}I -HDL restent plus longtemps dans la circulation sanguine par rapport aux souris contrôles (Figure 11 (C)), ce qui prouve le rôle de SR-BI (qui diminue avec le traitement à l'AICAR et la metformine) dans la clairance des HDL. L'AICAR semble ne pas avoir d'effets significatif sur la clairance et la captation sélective des EC des LDL, même si nous observons une augmentation très importante (Figure 12 et tableau 10), probablement du fait que le nombre de souris utilisées (4 souris) n'était pas suffisant.

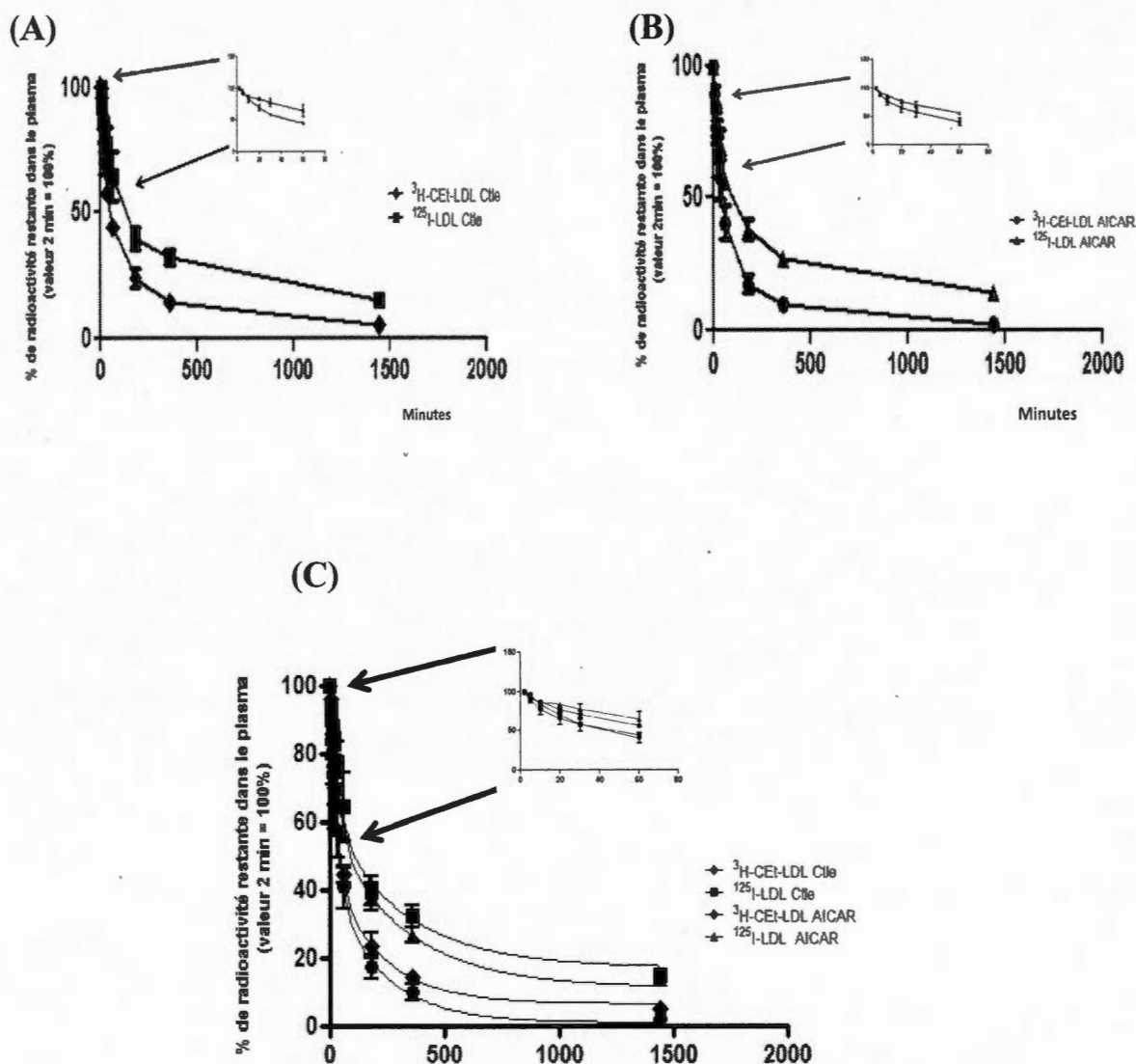


Figure 10: Clairance *in vivo* des LDL injectées à des souris contrôles ou traitées avec l'AICAR. (A) Clairance de ^3H -CET-LDL et ^{125}I -LDL par des souris contrôles; (B) Clairance de ^3H -CET-LDL et ^{125}I -LDL par des souris traitées avec l'AICAR; (C) Clairance de ^3H -CET-LDL et ^{125}I -LDL des souris contrôles et des souris traitées avec l'AICAR. Des souris ont été traitées avec de l'AICAR à 0,5 mg/g de poids corporel pendant 14 jours et d'autres souris contrôles ont reçu du PBS. Au quinzième jour après le début du traitement, les souris ont été injectées dans la veine de la queue avec 20 μg de LDL marquées soit à l'iode-125 pour suivre les protéines ou avec du ^3H -CET pour suivre les lipides dans la circulation sanguine. Des prélèvements de 20 à 25 μl ont été faits par la veine saphène, à 2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 180 min, 360 min et 1440 min après les injections. La radioactivité des échantillons a été mesurée tel que décrit dans la section Matériel et méthodes et les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM selon un 100% attribué au temps deux minutes post-injection.

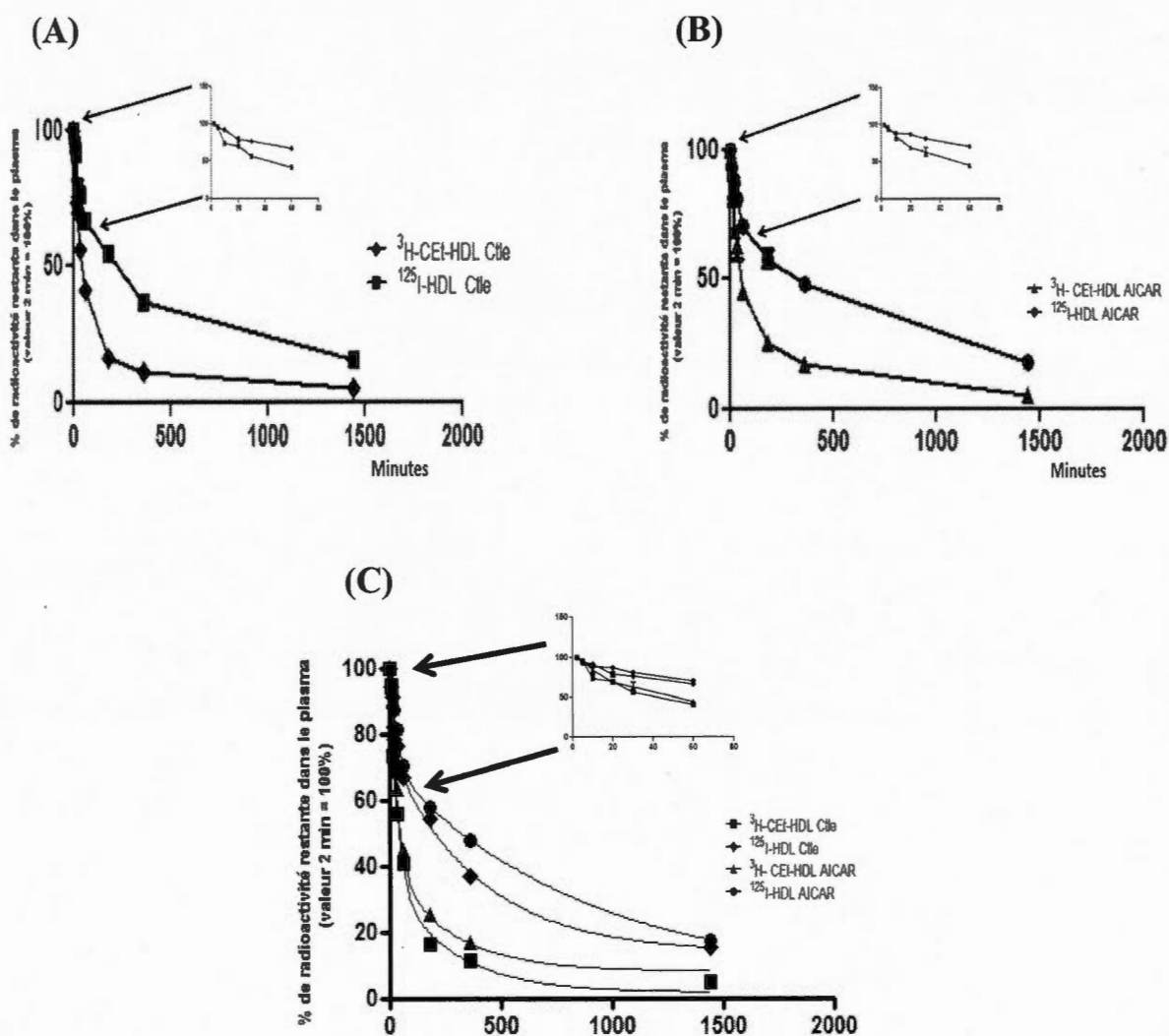


Figure 11: Clairance *in vivo* des HDL injectées à des souris contrôles ou traitées avec l'AICAR. (A) Clairance de ^3H -CET-HDL et ^{125}I -HDL par des souris contrôles; (B) Clairance de ^3H -CET-HDL et ^{125}I -HDL par des souris traitées avec l'AICAR; (C) Clairance de ^3H -CET-HDL et ^{125}I -HDL des souris contrôles et des souris traitées avec l'AICAR. Des souris ont été traitées avec de l'AICAR à 0,5 mg/g de poids corporel pendant 14 jours et d'autres souris contrôles ont reçu du PBS. Au quinzième jour après le début du traitement, les souris ont été injectées dans la veine de la queue avec 20 μg de HDL marquées soit à l'iode-125 pour suivre les protéines ou avec du ^3H -CET pour suivre les lipides dans la circulation sanguine. Des prélèvements de 20 à 25 μl ont été faits par la veine saphène, à 2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 180 min, 360 min et 1440 min après les injections. La radioactivité des échantillons a été mesurée tel que décrit dans la section Matériel et méthodes et les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM selon un 100% attribué au temps deux minutes post-injection. Les SEM n'apparaissent pas dans la figure en raison de leur petitesse.

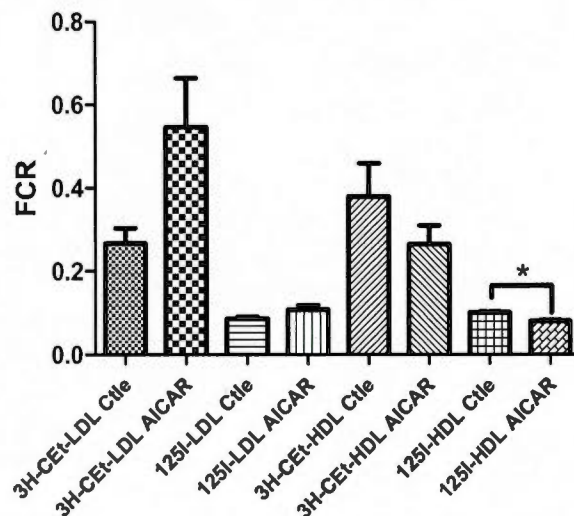


Figure 12 : FCR moyens des lipoprotéines injectées à des souris contrôles ou traitées avec l'AICAR. Les courbes de clairance ont été analysées par les FCR en utilisant deux compartiments selon le modèle de Matthews (1957) à l'aide des courbes de décroissance plasmatique selon la formule suivante : $FCR = 1 / (C1/b1 + C2/b2)$. C1 : " Percent Fast"; b1 : " K Fast" ; C2 : " K Slow" et b2 : "Percent Slow = 1 - Percent Fast" (Logiciel Prism 5). Les FCR (pool par minute) ont été calculés pour chaque souris. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne \pm SEM de 4 répétitions. Les analyses statistiques ont été faites par le test *t* de Student. La différence est significative à $p < 0,05$.

Tableau 10 : Récapitulatif des FCR de chaque lipoprotéine et du calcul de la captation sélective des EC en termes de pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport aux résultats des souris contrôles. La captation sélective est la différence entre les FCR moyens de $^3\text{H-CEt-lipoprotéine}$ et les FCR moyens de $^{125}\text{I-lipoprotéine}$. N.S. veut dire non significatif.

	$^3\text{H-CEt-LDL}$	$^{125}\text{I-LDL}$	$^3\text{H-CEt-HDL}$	$^{125}\text{I-HDL}$
Clairance globale	+100% (4) N.S.	+24,2% (4) N.S.	-30,2% (4) N.S.	-19,3% (4) $p < 0,05$
Clairance due à la captation sélective des EC	+140% N.S.		-34% $p < 0,05$	

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Dans le but d'étudier l'impact du métabolisme énergétique sur le métabolisme des lipoprotéines, nous avons ciblé l'activation de l'enzyme-clé de la balance énergétique l'AMPK qui, selon la littérature, améliore le bilan lipidique chez l'Homme. Ainsi, le traitement de personnes diabétiques avec la metformine, médicament permettant la phosphorylation de l'AMPK, a favorisé une diminution de 7% du taux de cholestérol associé aux LDL (Bolen *et al.*, 2007) et une augmentation de 5% de celui associé aux HDL (Salpeter *et al.*, 2008).

Dans le laboratoire de Dr Louise Brissette, les effets de la metformine et de l'AICAR (produit favorisant phosphorylation de l'AMPK) ont été étudiés sur les cellules HepG2. Cette étude avait démontré une augmentation du rLDL et du CD36, ainsi qu'une diminution de SR-BI (résultats non publiés). Nous avons voulu comparer, entre autres, ces effets *in vitro* avec les impacts de cette phosphorylation de l'AMPK *in vivo* chez la souris. Pour cela, nous avons traité des souris avec de la metformine et de l'AICAR à 0,5 mg/g de poids corporel pendant 7 ou 14 jours.

4.1 Effet de l'AMPK sur les HDL

La figure 5 (A) révèle une diminution du cholestérol plasmatique total au niveau des souris traitées avec l'AICAR ou la metformine pendant 14 jours. Ainsi, l'AMPK phosphorylée semblait favorable pour la santé pendant une durée de 14 jours. Or, le taux de cholestérol associé aux HDL démontre le contraire, car il chute de 26,2% et 21,1% chez les souris traitées avec l'AICAR pendant 7 et 14 jours respectivement.

Pour mieux expliquer les variations inattendues des taux de cholestérol plasmatique (augmentation du taux de cholestérol associé aux LDL et diminution de celui associé aux HDL contrairement aux résultats des groupes de Bolen (2007) et Salpeter (2008) respectivement), nous avons procédé à la quantification de certains récepteurs et

protéines intervenant dans le métabolisme des lipoprotéines. La diminution de cholestérol associé aux HDL aurait pu être un reflet d'une augmentation de l'expression du SR-BI, le récepteur responsable du métabolisme des HDL, mais c'est plutôt le contraire puisque tant au niveau protéique qu'au niveau mRNA, des diminutions ont été observées (Figure 7 (A)). De plus, nous avons même eu une diminution de la protéine PDZK1 (Figure 6), responsable du maintien de SR-BI à la surface cellulaire. Tout ceci devrait pourtant se capitaliser en une augmentation importante du taux de cholestérol des HDL, or il n'en est rien. Fait intéressant, les résultats de Rhainds et Brissette sur les cellules HepG2, avait aussi révélé une diminution de SR-BI et une augmentation de captation sélective des EC des HDL. Cette étude non publiée a démontré une augmentation du taux de CD36. Il est donc possible qu'un taux protéique augmenté de CD36 ait été responsable de la hausse de captation sélective par les cellules HepG2. Nos travaux chez la souris n'ont pas démontré d'effet de l'AICAR ou la metformine sur le CD36 (Figure 6). Toutefois, l'AICAR augmente l'expression de SR-BII (expérience faite seulement sur les souris traitées avec l'AICAR pendant 7 ou 14 jours). Chez la souris, il se pourrait que l'AICAR en augmentant le niveau de SR-BII et en diminuant celui de SR-BI mène à une augmentation de captation sélective des EC des HDL (et des LDL). Or, ceci serait surprenant, car il fut démontré *in vitro* que le SR-BII a une capacité de captation sélective beaucoup plus faible que le SR-BI (Webb *et al.*, 1998).

Ces variations des taux de cholestérol et de récepteurs et protéines intervenant dans le métabolisme lipidique nous ont amené à analyser l'effet de l'AICAR sur la clairance des protéines et des EC des HDL et des LDL (*in vivo* chez la souris). Ceci constitue d'ailleurs un élément novateur de nos travaux. Ainsi, la figure 11 (C) et le tableau 10 démontrent une diminution de la captation sélective des EC des HDL, ce qui pourrait être un résultat de la diminution de l'expression de SR-BI, d'où l'importance de ce récepteur dans la clairance des HDL. Aussi, il faut en déduire que la hausse de SR-BII semble ne pas avoir d'effet sur cette captation sélective des EC de HDL. Cette diminution de la clairance due à la captation sélective des EC des HDL (Tableau 10) devrait augmenter le taux de cholestérol associé aux HDL, or ce taux a diminué. Nous avons ainsi pensé à une diminution de la synthèse des particules HDL. Ainsi, nos résultats préliminaires démontrent que l'activation de l'AMPK réduit la quantité d'ABCA1 et de HNF4 α dans le

foie (Figure 8). Wong et ses collaborateurs (2006) ont démontré que le SREBP-2 joue un rôle essentiel dans la régulation positive de l'expression du gène qui code pour l'ABCA1. Donc, probablement l'activation de l'AMPK inhibe l'expression de ce gène. Il est donc probable que la diminution du taux de cholestérol associé aux HDL bien évidemment via la phosphorylation de l'AMPK, résulte d'une diminution du taux sanguin de HDL soit par l'inhibition de leur maturation via l'inhibition de l'expression du gène qui code pour l'apoA-I ou, carrément, de leur formation. Aussi, il apparaît que l'effet de HNF4 α et d'ABCAI est plus important que celui de la baisse de SR-BI sur le taux de cholestérol associé aux HDL.

4.2 Effet de l'AMPK sur les LDL

Le taux de cholestérol associé aux LDL a augmenté avec tous les traitements. Cette augmentation a dépassé 46% et 18% dans le cas des souris traitées avec les deux produits pendant 14 ou 7 jours, respectivement (Figure 5 (B) et tableau 7).

L'administration de l'AICAR ou de la metformine augmente le taux d'expression de la protéine rLDL (Figure 6) et ceci est corrélé à l'augmentation de son ARNm (traitement avec AICAR pendant 14 jours) (Figure 7 (B)) suite à l'augmentation de son facteur de transcription SREBP-2 (Figure 6). Ce régulateur favorise l'expression de l'ARNm du rLDL (Horton *et al.*, 1998; Castoreno, 2005) et de PCSK9 (Horton *et al.*, 2007). La protéine PCSK9 est l'un des régulateurs du rLDL (Abifadel *et al.*, 2003) favorisant sa dégradation lysosomale (Ni *et al.*, 2010). Ainsi, la figure 7 (C) démontre une augmentation du taux d'expression de l'ARNm de PCSK9, ce qui pourrait révéler une augmentation beaucoup plus importante du rLDL que celle observée au niveau de la figure 6 puisque la protéine PCSK9 (s'il y avait une traduction de son ARNm) a vraisemblablement provoqué la dégradation d'une partie des rLDL. Aussi, nous pouvons observer, à la figure 6, une faible augmentation du LXR α avec les deux traitements. Or, selon Engelking et ses collaborateurs (2012), le LXR α diminue pour favoriser l'augmentation de l'expression du rLDL via une augmentation de SREBP-2 et une diminution de l'expression d'IDOL au niveau des entérocytes traitées avec l'ézétimibe. Cette contradiction peut être expliquée par une augmentation insuffisante de LXR α .

Ainsi, le LXR α inducible est abondamment exprimé dans le foie (Zhao et Dahlman-Wright, 2010) donc seule la mesure du LXR α nucléaire confirmerait que certains gènes pourraient avoir été stimulés ou non par celui-ci.

Une augmentation du taux de cholestérol associé aux LDL, comme nous l'avons observée, peut aussi être liée à une diminution de la captation sélective des EC par le SR-BI. Or, le taux de SR-BI est réduit chez les souris traitées avec les activateurs d'AMPK. Nous nous attendions donc à une diminution de la captation sélective des EC des LDL qui aurait aussi pu être responsable d'une augmentation du taux de cholestérol associé aux LDL. Or, l'activité de l'AMPK ne semble pas affecter cette captation (Figure 12 et tableau 10). Donc, nos travaux n'ont pas réussi à expliquer la hausse de cholestérol associé aux LDL.

4.3 Effet de l'AMPK sur les lipides hépatiques

Comme ce qui était attendu, la phosphorylation de l'AMPK a permis de diminuer le taux des lipides hépatiques. Ainsi, la figure 9 (A) démontre une diminution du cholestérol hépatique avec les deux traitements (13,4% pour l'AICAR pendant 14 jours et 16,1% pour la metformine pendant 14 jours), ce qui est en accord avec les résultats d'Oliaro-Bosso et ses collaborateurs (2009) démontrant que l'AMPK activée inhibe l'expression de l'HMGCoA-red et donc de la synthèse du cholestérol endogène (Saucier *et al.*, 1989). Aussi, la diminution du taux de cholestérol hépatique pourrait être un résultat de la diminution de la captation sélective des EC des HDL. Nous ne pouvons donc pas discriminer entre ces deux causes probables.

Le taux des triglycérides hépatiques, quant à lui, diminue de 26% mais seulement chez les souris traitées avec l'AICAR pendant 14 jours. Il est connu que le facteur de transcription SREBP-1, une fois activé, induit l'expression de la «glycerol-3-phosphate acyltransferase» (GPAT), une enzyme intervenant dans la synthèse des TG (Hagen *et al.*, 2010). De plus, le groupe du Dr Viollet (1998) a démontré que la surexpression de l'AMPK α 2 provoque une diminution de l'ARNm de SREBP-1 chez la souris. Ainsi, l'accumulation des TG au niveau du muscle ou du foie peut être un résultat d'une

augmentation de la synthèse des acides gras contrôlée par l'ACC (Munday et Hemingway, 1999). Cependant, Carling et ses collaborateurs (1987) ont démontré que cette enzyme peut être inhibée par l'activation de l'AMPK. Donc, dans notre expérience, la diminution des triglycérides hépatiques peut être un résultat de l'inhibition de l'ACC ou bien de la diminution la synthèse de la GPAT via la répression du gène qui code pour le SREBP-1 suite à la phosphorylation de l'AMPK par le traitement l'AICAR.

4.4 Synthèse générale

Les résultats obtenus suite aux traitements des souris par l'AICAR ou la metformine peuvent être regroupés dans le schéma suivant :

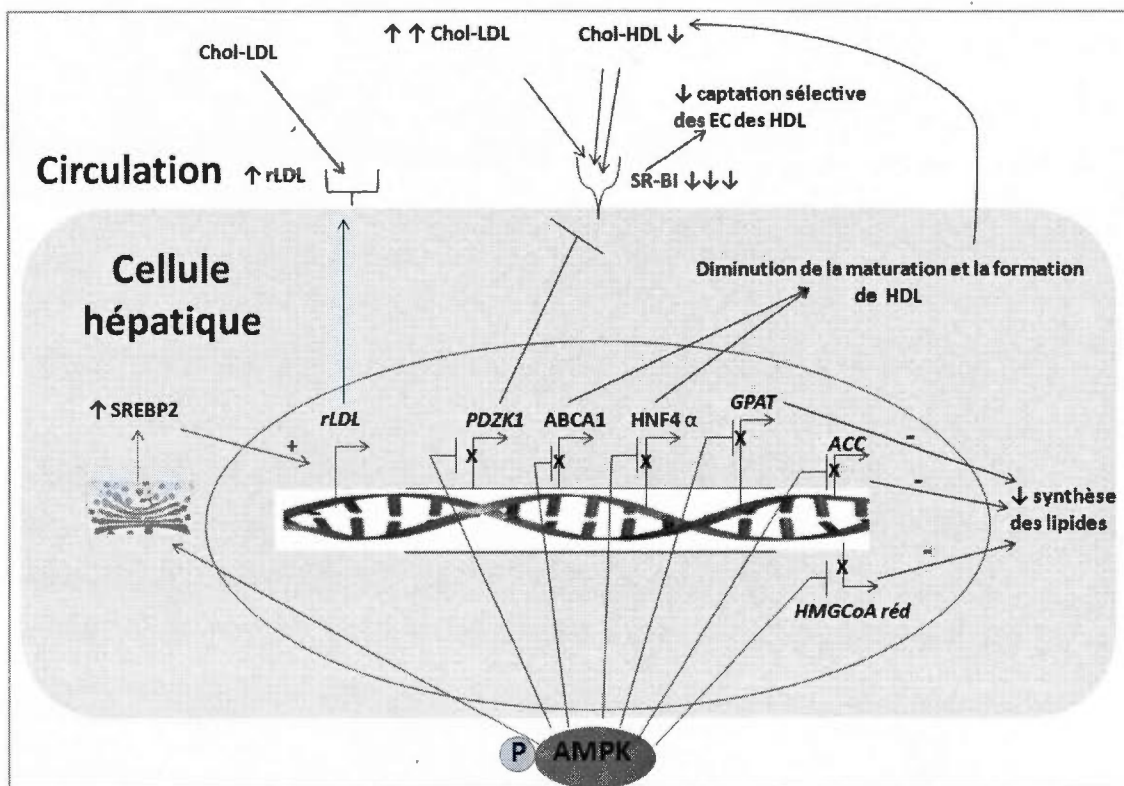


Figure 13 : Effet de l'activation de l'AMPK sur le métabolisme des lipoprotéines chez la souris. L'AMPK (activée par phosphorylation) active l'expression du gène de rLDL qui capte le cholestérol associé aux LDL et inhibe la synthèse des lipides hépatiques et de certains gènes intervenant dans la captation du cholestérol associé aux HDL.

Ainsi, tel que le démontre cette dernière figure, une fois activée par phosphorylation, l'AMPK diminue la synthèse des TG, du cholestérol hépatique et des acides gras via une inhibition de la GPAT, de l'HMGCoA red et de l'ACC, respectivement. L'AMPK activée favorise aussi la maturation de SREBP2 qui induit la transcription du gène qui code pour le rLDL. Elle active aussi l'expression du gène de PCSK9 qui théoriquement devrait dégrader une partie des rLDL, laissant malgré tout un taux plus élevé de ce récepteur. Toutefois cette augmentation semble ne pas être suffisante pour favoriser la diminution du taux de cholestérol associé aux LDL (qui augmente). Différemment, l'expression du gène de SR-BI est réduite. De plus, l'expression de la protéine adaptatrice PDZK1 diminue pour réduire vraisemblablement la translocation de SR-BI à la surface cellulaire. Les effets sur SR-BI et PDZK1 pourraient fort bien expliquer la diminution de la clairance plasmatique des EC des HDL telle que démontrée par la diminution des FCR associés à la captation sélective des EC chez les souris traitées. Toutefois ceci aurait dû augmenter le taux de cholestérol associé aux HDL, ce qui ne fut pas le cas. Or nos résultats préliminaires suggèrent que l'AMPK activée inhibe plutôt l'expression de l'ABCA1 et l'HNF4 α , ce qui diminuerait la formation et la maturation de la particule HDL et donc expliquerait la réduction du taux de cholestérol associé aux HDL, malgré une diminution de la captation sélective des EC des HDL détectée *in vivo* chez les souris traitées. Cependant, la diminution de SR-BI ne réduit pas la captation sélective des EC des LDL. Donc, nos travaux n'ont pas réussi à expliquer la hausse de cholestérol associé aux LDL que ce soit en fonction de l'activité du rLDL ou de celle de SR-BI.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos résultats démontrent que l'activation de l'AMPK par l'AICAR ou la metformine provoque, *in vivo* chez la souris, certains effets similaires et d'autres contradictoires à ce qui a été observé *in vitro* au niveau des cellules HepG2. Dans les deux séries d'expériences, le SR-BI a diminué, le rLDL a augmenté alors que l'augmentation de CD36 au niveau des cellules HepG2 a été remplacée par une augmentation de SR-BII chez la souris. Inattendue, la diminution du taux de cholestérol plasmatique total chez la souris est due à une forte diminution de cholestérol des HDL accompagnée d'une augmentation de celui des LDL. Ces deux phénomènes pourraient favoriser l'athérosclérose. Ainsi, l'analyse de l'ensemble des résultats démontre que l'activation de l'AMPK a un effet favorable pour la santé en diminuant la synthèse de lipides hépatiques et en favorisant la diminution du cholestérol total mais l'augmentation de celui associé aux LDL et la diminution de celui associé aux HDL semblent défavorables. Nos résultats se distinguent de ceux obtenus chez des personnes atteintes de diabète de type 2 traitées à la metformine qui avaient démontré une réduction de 7% du taux de cholestérol associé aux LDL (Bolen *et al.*, 2007) et une augmentation de 5% de celui associé aux HDL (Salpeter *et al.*, 2008). Cette contradiction peut être expliquée soit par le fait que chez les diabétiques, la régulation des protéines et des récepteurs intervenant dans le métabolisme lipidique en réponse à la phosphorylation de l'AMPK ne se fait pas de la même manière que chez les personnes normales, soit par la différence de proportions en HDL et LDL entre l'Homme et la souris. Comme perspectives, nous suggérons aussi de refaire cette étude sur un nombre plus élevé de souris traitées avec l'AICAR ou la metformine pour augmenter les chances d'avoir des différences significatives des FCR, car en effet nos effectifs de quatre souris par groupe se sont révélés trop petits. De plus, il serait intéressant de suivre dans le temps les effets de ces produits. Donc des souris pourraient être traitées pendant des périodes plus longues. Aussi, l'activité de l'HMGC_oA red pourrait être mesurée afin d'expliquer si la diminution du taux de cholestérol hépatique est due à la diminution de sa synthèse ou à la diminution de la captation sélective des EC des HDL. De plus, il serait intéressant de quantifier les protéines SREBP-1, GPAT et ACC pour expliquer la diminution des TG hépatiques. La souris normale étudiée a de

faibles probabilités de développer l'athérosclérose du fait qu'elle possède peu de cholestérol associé aux LDL contrairement à l'Homme, chez lequel, la diminution du cholestérol associé aux HDL peut se refléter sur le taux de cholestérol associé aux LDL grâce à l'action de la CETP que la souris ne possède pas. Donc, des souris transgéniques "Humanisées" exprimant l'apoB et la CETP humaines qui ont des taux de lipoprotéines similaires à ceux des humains pourraient être utilisées comme modèle expérimental afin d'écarter ou de retenir la possibilité que la variation des proportions de HDL et LDL entre l'Homme et la souris soit à l'origine de variations contradictoires obtenues entre ces deux espèces.

Nous proposons aussi de faire des études *in vitro* sur les cellules HepG2 afin de déterminer l'effet de l'activation de l'AMPK sur le taux d'expression de SR-BII, pour définir, premièrement, si son taux augmente aussi dans cette cellule d'origine humaine et tenter, deuxièmement, de comprendre son rôle dans la captation sélective des EC des LDL. Il faudrait aussi se concentrer sur la synthèse de l'apoA-I par cette cellule, c'est-à-dire déterminer si l'ABCA1 ainsi que l'HNF4 α sont aussi des cibles de l'activation de l'AMPK dans ces cellules. De plus, ces dernières pourraient être utilisées dans des études d'efflux de cholestérol et taux de sécrétion d'apoA-I, ce qui pourrait nous informer de l'impact de l'AMPK activée dans la synthèse des particules HDL. Aussi, la mesure du taux d'expression du gène qui code pour d'apoA-I ainsi que sa traduction en protéine pourrait nous indiquer l'effet de l'HNF4 α sur la biogenèse des HDL. Finalement, si nous pouvons confirmer une diminution de PDZK1 dans les cellules HepG2 traitées à l'AICAR et/ou la metformine, des expériences pourraient être réalisées pour définir la proportion de SR-BI à la surface cellulaire afin de confirmer l'impact de PDZK1. Aussi, la mesure du niveau de phosphorylation de la sous-unité l'AMPK α suite au traitement avec l'AICAR ou la metformine sera intéressante pour déterminer si l'ensemble des changements dans le métabolisme lipidique observés dans cette étude était un effet direct de la phosphorylation de cette protéine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D. and Boileau, C. 2003.** Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **34**: 154-156.
- Acton, S. L., Rigotti, A., Landschultz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H. and Krieger, M. 1996.** Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **271**: 518-520.
- Acton, S. L., Scherer, P. E., Lodish, H. F. and Krieger, M. 1994.** Expression cloning of SR-BI, a CD36 related class B scavenger-receptor. *J. Biol. Chem.* **269**: 21003-21009.
- Algire, C., Zakikhani, M., Blouin, M. J., Shuai, J. H. and Pollak, M. 2008.** Metformin attenuates the stimulatory effect of a high-energy diet on in vivo LLC1 carcinoma growth. *Endocrinol. Relat. Cancer* **3**: 833-839.
- Andersen, M., Lenhard, B., Whatling, C., Eriksson, P. and Odeberg, J. 2006.** Alternative promoter usage of the membrane glycoprotein CD36. *BMC Mol. Biol.* **7**: 3177-3184.
- Annema, W. and Tietge, U. J. 2011.** Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Curr. Atheroscler. Rep.* **13**: 257-265.
- Arsenault, B. J., Lemieux, I., Despres, J. P., Gagnon, P., Wareham, N. J., Stroes, E. S., Kastelein, J. J., Khaw, K. T. and Boekholdt, S. M. 2009.** HDL particle size and the risk of coronary heart disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *Atherosclerosis* **206**: 276-281.
- Asztalos, B. F., de la Llera-Moya, M., Dallal, G. E., Horvath, K. V., Schaefer, E. J. and Rothblat, G. H. 2005.** Differential effects of HDL subpopulations on cellular ABCA1- and SR-BI-mediated cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* **46**: 2246-2253.
- Badole, S. L. and Bodhankar, S. L. 2008.** Effect of concomitant administration of aqueous extract of pleurotus pulmonarius and metformin in diabetic mice. *J. Compl. Integr. Med.* **5**: 1-13.
- Baigent, C., Keech, A., Kearney, P. M., Blackwell, L., Buck, G., Pollicino, C., Kirby, A., Sourjina, T., Peto, R., Collins, R. and Simes, R. 2005.** Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: Prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* **366**: 1267-1278.
- Ballantyne, C. M., Raichlen, J. S. and Cain, V. A. 2008.** Statin therapy alters the relationship between apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol and non-high-density lipoprotein cholesterol targets in high-risk patients: the MERCURY II (Measuring Effective Reductions in Cholesterol Using Rosuvastatin) trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **52**: 626-632.

- Betteridge, D. J. 1999.** Diabetic dyslipidaemia. *Eur. J. Clin. Invest.* **29**: 12-16.
- Bolen, S., Feldman, L., Vassy, J., Wilson, L., Yeh, H. C., Marinopoulos, S., Wiley, C., Selvin, E., Wilson, R., Bass, E. B. and Brancati, F. L. 2007.** Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* **147**: 386-399.
- Bonen, A., Luiken, J., Arumugam, Y., Glatz, J. and Tandon, N. N. 2000.** Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J. Biol. Chem.* **275**: 14501-14508.
- Brewer, H. B. 2007.** HDL metabolism and the role of HDL in the treatment of high-risk patients with cardiovascular disease. *Curr. Cardiol. Rep.* **9**:486-492.
- Brisette, L., Charest, M. C. and Faltraut, L. 1996.** Selective uptake of cholesteryl esters of low-density lipoproteins is mediated by the lipoprotein-binding site in HepG2 cells and is followed by the hydrolysis of cholesteryl esters. *Biochem. J.* **318**: 841-847.
- Brodeur, M. R., Bourret, G., Faltraut, L. and Brisette, L. 2005.** Physiological importance of SR-BI in the *in vivo* metabolism of human HDL and LDL in male and female mice. *J. Lipid Res.* **46**: 687-696.
- Brouwers, M. C. and Stehouwer, C. D. 2012.** Niacin in cardiovascular patients receiving statins. *N. Engl. J. Med.* **366**: 1255-1256.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1974.** Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *J. Biol. Chem.* **249**: 7306-7314.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1986.** A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, **232**: 34-47.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1997.** The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**: 331-340.
- Brown, M. S., Dana, S. E. and Goldstein, J. L. 1974.** Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* **249**: 789-796.
- Brown, M. S., Kovanen P. T. and Goldstein, J. L. 1979.** Receptor-mediated uptake of lipoprotein cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Recent Prog. Horm. Res.* **35**: 25-57.
- Brugger, D., Schuster, H. and Zollner, N. 1996.** Familial hypercholesterolemia and familial defective apolipoprotein B-100: comparison of the phenotypic expression in 116 cases. *Eur. J. Med. Res.* **1**: 383-386.
- Burnette, W. N. 1981.** "Western blotting": Electrophoresis transfer of protein from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and

radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal. Biochem.* **112**: 195-203.

Buzzai, M., Jones, R. G., Amaravadi, R. K., Lum, J. J., DeBerardinis, R. J., Zhao, F., Viollet, B. and Thompson, C. B. 2007. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res.* **67**: 6745-6752.

Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Suarez, Y., Lasuncion 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.

Cantz, T., Jochheim, A., Cieslak, A., Hillemann, T., Scharf, J., Manns, M. P. and Ott, M. 2003. PCR-based quantification of amplified RNA from laser microdissected mouse liver samples. *Exp. Mol. Pathol.* **75**: 53-57.

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 a transcriptional control by steroidogenic factor 1. *J. Biol. Chem.* **272**: 33068-33076.

Carling, D., Zammit, V. A. and Hardie, D. G. 1987. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett.* **223**: 217-222.

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

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

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. *Biochemistry* **346**: 659-669.

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

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

Costet, P., Cariou, B., Lambert, G., Lalanne, F., Lardeux, B., Jarnoux, A., Aldo Grefhorst, A., Staels, B. and Krempf, M. 2006. Hepatic PCSK9 expression is regulated

by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J. Biol. Chem.* **10**: 6211-6218.

Cuchel, M. and Rader, D. J. 2006. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation* **113**: 2548-2555.

Cusi, K., Consoli, A. and DeFronzo, R. A. 1996. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**: 4059-4067.

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

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

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

Eisenberg, S. and Levy, R. I. 1975. Lipoprotein metabolism. *Adv. Lipid Res.* **13**: 1-89.

Engelking, L. J., McFarlane, M. R., Li, C. K. and Liang, G. 2012. Blockade of cholesterol absorption by ezetimibe reveals a complex homeostatic network in enterocytes. *J. Lipid Res.* **53**: 1359-1368.

Erickson, K. A., Smith, M. E., Anthonymuthu, T. S., Evanson, M. J., Brassfield, E. S., Hodson, A. E., Bressler, M. A., Tucker, B. J., Thatcher, M.O., Prince, J. T., Hancock, C. R. and Bikman, B. T. 2012. AICAR inhibits ceramide biosynthesis in skeletal muscle. *Diabetol. Metab. Syndr.* **4**: 45.

Fahed, A. C. and Nemer, G. M. 2011. Familial Hypercholesterolemia: A genotype/phenotype correlation. *Mol. Genet. Metab.* **102**: 181-188.

Fluiter, K., Van Der Westhuijzen, D. R. and Van Berkel, T. J. 1998. In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 8434-8438.

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

Foretz, M., Ancellin, N., Andreelli, F., Saintillan, Y., Grondin, P., Kahn, A., Thorens, B., Vaulont, S. and Viollet, B. 2005. Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes* **54**: 1331-1339.

- Foretz, M., Carling, D. Guichard, C. Ferré, P. and Foufelle, F. 1998.** AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **273**: 14767-14771.
- Giri, S., Rattan, R., Haq, E., Khan, M., Yasmin, E., Won, J., Key, L., Singh, A. K. and Singh, I. 2006.** AICAR inhibits adipocyte differentiation in 3T3L1 and restores metabolic alterations in diet-induced obesity mice model. *Nutr. Metab.* **3**:31.
- Goldstein, J. L., Anderson, R. W. G. and Brown, M. S. 1979.** Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. *Nature* **279**: 679-685.
- Graf, G. A., Roswell, K. L. and Smart, E. J. 2001.** 17beta-Estradiol promotes the upregulation of SR-BII in HepG2 cells and in rat livers. *J. Lipid Res.* **42**: 1444-1449.
- Greene, D. J., Skeggs, J. W. and Morton, R. E. 2001.** Elevated triglyceride content diminishes the capacity of high density lipoprotein to deliver cholesteryl esters via the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *J. Biol. Chem.* **276**: 4804-4811.
- Greenwalt, D. E., Lipsky, R. H., Ockenhouse, C. F., Ikeda, H., Tandon, N. N. and Jamieson, G. A. 1992.** Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction and transfusion medicine. *Blood* **80**: 1105-1115.
- Grossman, A. B., Korbonits, M., Kola, B., Boscaro, M., Rutter, G. A., Kola, B. and Boscaro, M. 2006.** Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**: 205-215.
- Guigas, B., Bertrand, L., Taleux, N., Foretz, M., Wiernsperger, N., Vertommen, D., Andreelli, F., Viollet, B. and Hue, L. 2006.** 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-1-β-D-Ribofuranoside and Metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation. *Diabetes* **55**: 865-874.
- Gunton, J. E., Delhanty, P. J., Takahashi, S. 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.
- Habets, D. D. J., Coumans, W. A., Voshol, P. J., den Boer, M. A. M., Febbraio, M., Bonen, A., Glatz, J. F. C. and Luiken, J. F. P. 2007.** AMPK-mediated increase in myocardial long-chain fatty acid uptake critically depends on sarcolemmal CD36. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**: 204-210.
- Hagen, R., M., Rodriguez-Cuenca, S. and Vidal-Puig, A. 2010.** An allostatic control of membrane lipid composition by SREBP1. *FEBS Letters.* **584** : 2689-2698. (Article de revue).
- Halseth, A. E., Ensor, N. J., White, T. A., Ross, S. A. and Gulve, E. A. 2002.** Acute and chronic treatment of ob/ob and db/db mice with AICAR decreases blood glucose concentrations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**: 798-805.

Hardie, D. G. 2004. The AMP-activated protein kinase pathway: new players upstream and downstream. *Cell Sci.* **117**: 5479-5487.

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

Hashimoto, T., Segawa, H., Okuno, M., Kano, H., Hamaguchi, H. O., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Hasui, S., Yamaguchi, T., Hirose, F. and Osumi, T. 2012. Active involvement of micro-lipid droplets and lipid droplet-associated proteins in hormone-stimulated lipolysis in adipocytes. *J. Cell Sci.* **125**: 6127-6136.

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

Heishi, M., Ichihara, J., Teramoto, R., Itakura, Y., Hayashi, K., Ishikawa, H., Gomi, H., Sakai, J., Kanaoka, M., Taiji, M. and Kimura, T. 2006. Global gene expression analysis in liver of obese diabetic db/db mice treated with metformin. *Diabetologia* **7**: 1647-1655.

Hong, Y. H., Varanasi, U. S., Yang, W. and Leff, T. 2003. AMP-activated protein kinase regulates HNF4 transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *J. Biol. Chem.* **278**: 27495-501.

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

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

Hundal, H. S., Ramlal, T., Reyes, R., Leiter, L. A. and Klip, A. 1992. Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. *Endocrinology* **131**: 1165-1173.

Hussain, M. M., Kancha, R. K., Zhou, Z. Y., Luchoomun, J., Zu, H. Y. and Bakillah, A. 1996. Chylomicron assembly and catabolism ; role of apolipoproteins and receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1300**: 151-170.

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

Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., de la Llera-Moya, M., Phillips, M. C., Rothblat, G. H., Swaney, J. B. and Tall, A. R. 1997. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* **272**: 20982-20985.

Jiao, S., Cole, T. G., Kitchens, T. T., Pflieger, B. and Schonfeld, G. 1990. Genetic heterogeneity of lipoproteins in inbred strains of mice: analysis by gel-permeation chromatography. *Metabolism* **39**:155-160.

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

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

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

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

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

Kostner, K. 2002. Beyond LDL-Cholesterol: New treatments raising HDL-Cholesterol or enhancing reverse cholesterol transport. *J. Cardiol.* **9**: 328-331.

Kozarsky, K. F., Donahee, M. H., Glick, J. M., Krieger, M. and Rader, D. J. 2000. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**: 721-727.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Landschultz, K. T. Pathak, R. K Rigotti, A. Krieger, M. and Hobbs, H. H. 1996. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J. Clin. Invest.* **98**: 984-995.

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

LaRosa, J. C., Levy, R. I., Herbert, P., Lux, S. E. and Fredrickson, D. S. 1970. A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41**: 45-62.

Leick, L., Fentz, J., Biensø, R. S., Knudsen, J. G., Jeppesen, J., Kiens, B., Wojtaszewski, J. F. P. and Pilegaard, H. 2010. PGC-1 α is required for AICAR-

induced expression of GLUT4 and mitochondrial proteins in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**: 456-465.

Longnus, S. L., Wambolt, R. B., Parsons, H. L., Brownsey, R. W. and Allard, M. F. 2003. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) stimulates myocardial glycogenolysis by allosteric mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **284**: 936-944.

Lopez, D. and McLean, M. P. 2006. Estrogen regulation of the scavenger receptor class B gene: Anti-atherogenic or steroidogenic, is there a priority? *Mol. Cell. Endocrinol.* **247**: 22-33.

Lotufo, P. A., Gaziano, J. M., Chae, C. U., Ajani, U. A., Moreno-John, G., Buring, J. E. and Manson, J. E. 2001. Diabetes and all-cause and coronary heart disease mortality among US male physicians. *Arch. Inter. Med.* **161**: 242-247.

Lowry, A. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

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.

Luiken, J., Coort, S. L., Willems, J., Coumans, W. A., Bonen, A., Van Der Vusse, G. J. and Glatz, J. F. 2003. Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signalling. *Diabetes* **52**: 1627-1634.

Lundberg, V., Stegmayr, B., Asplund, K., Eliasson, M. and Huhtasaari, F. 1997. Diabetes as a risk factor for myocardial infarction: population and gender perspectives. *J. Intern. Med.* **241**: 485-492.

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

Maida, A., Lamont, B. J., Cao, X. and Drucker, D. J. 2011. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice. *Diabetologia* **54**: 339-349.

Malerød, L., Juvet, L. K., Bauer, A. H., Eskild, W. and Berg, T. T. 2002. Oxysterol-activated LXRA α /RXR induces SR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **299**: 916-923.

Matsuyama, H., Sato, K., Nakamura, Y., Suzuki, K. and Akiba, Y. 2005. Modulation of regulatory factors involved in cholesterol metabolism in response to feeding of pravastatin- or cholesterol-supplemented diet in chickens. *Biochim. Biophys. Acta* **1734**: 136-142.

- Matthews, M. E. 1957.** The theory of tracer experiments with ^3H -labelled plasma proteins. *Physiol. Med. Biol.* **2**: 36-53.
- McFarlane, A. S. 1948.** Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* **182**: 53-54.
- Miller, R. A. and Birnbaum, M. J. 2010.** An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin. *J. Clin. Invest.* **120**: 2267-2270.
- Munday, M. R. and Hemingway, C. J. 1999.** The regulation of acetyl-CoA carboxylase: a potential target for the action of hypolipidemic agents. *Adv. Enzyme Regul* **39**: 205-234.
- Nauli, A. M., Nassir, F., Zheng, S., Yang, Q. and Lo, C. M. 2006.** CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology* **131**: 1197-1207.
- Ngoka, L. C. M. 2008.** Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilisation preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers. *Proteome Sci.* **6**: 30.
- Ni, Y. G., Condra, J. H., Orsatti, L., Shen, X., Di Marco, S., Pandit, S., Bottomley, M. J., Ruggeri, L., Cummings, R. T. and Cubbon, R. M. 2010.** A proprotein convertase subtilisin-like/kexin type 9 (PCSK9) C-terminal domain antibody antigen-binding fragment inhibits PCSK9 internalization and restores low density lipoprotein uptake. *J. Biol. Chem.* **285**: 12882-12891.
- Niemeir, A., Kovacs, W. J., Strobl W. and Stangl, H. 2009.** Atherogenic diet leads to posttranslational down-regulation of murine hepatocyte SR-BI expression. *Atherosclerosis* **202**: 169-175.
- Oliaro-Bosso, S., Calcio Gaudino, E., Mantegna, S., Giraud, E., Meda, C., Viola, F. and Cravotto, G. 2009.** Regulation of HMGCoA reductase activity by policosanol and octacosadienol, a new synthetic analogue of octacosanol. *Lipids* **44**: 907-916.
- Oram, J. F., Lawn, R. M., Garvin, M. R. and Wade, D. P. 2000.** ABCA1 is the cAMPinducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J. Biol. Chem.* **275**: 34508-34511.
- 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.
- Peet, D. J., Turley, S. D., Ma, W., Janowski, B. A., Lobaccaro, J. M., Hammer, R. E. and Mangelsdorf, D. J. 1998.** Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* **93**: 693-704.
- Powell, L. M., Wallis, S. C., Pease, R. J., Edwards, Y. H., Knott, T. J. and Scott, J. 1987.** A novel form of tissue specific RNA processing produced apo-B48 in intestine. *Cell* **50**: 831-840.

- Rac, M. E., Safranow, K. and Poncyljusz, W. 2007.** Molecular Basis of Human CD36 Gene Mutations. *Mol. Med.* **13**: 288-296.
- Rashid, S., Curtis, D. E., Garuti, R., Anderson, N. N., Bashmakov, Y., Ho, Y. K., Hammer, R. E., Moon, Y. A. and Horton, J. D. 2005.** Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking PCSK9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 5374-5379.
- Repa, J. J. and Mangelsdorf, D. J. 2000.** The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Cell Dev. Biol.* **16**: 459-481.
- Rhains, D., Brodeur, M., Lapointe, J., Charpentier, D., Falstraalt, L. and Brissette, L. 2003.** The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters. *Biochemistry* **42**: 7527-7538.
- Rhains, D., Bourgeois, P., Bourret, G., Huard, K., Falstraalt, L. and Brissette, L. 2004.** Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. *J. Cell Sci.* **117**: 3095-3105.
- Rigotti, A., Trigatti, B. L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J. and Krieger, M. 1997.** A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94**: 12610-12615.
- Roberts, D. C., Miller, N. E. Price, S. G., Crook, D. Cortese, C., La Ville, A., Masana, L. and Lewis, B. 1985.** An alternative procedure for incorporating radiolabelled cholesteryl ester into human plasma lipoproteins in vitro. *Biochem. J.* **226**: 319-322.
- Salpeter, S. R., Buckley, N. S., Kahn J. A., and Salpeter, E. E. 2008.** Meta-analysis: metformin treatment in persons at risk for diabetes mellitus. *Am. J. Med.* **121**:149-157.
- Salt, I. P., Johnson, G., Ashcroft, S. J. and Hardie, D. G. 1998.** AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release. *Biochem. J.* **335**: 533-539.
- Saucier, S. E., Kandutsch, A. A., Gayen, A. K., Swahn, D. K. and Spencer, T. A. 1989.** Oxysterol regulators of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in liver. Effect of dietary cholesterol. *J. Biol. Chem.* **264**: 6863-6869.
- Shore, S. A., Williams, E. S. and Zhu, M. 2008.** No effect of metformin on the innate airway hyperresponsiveness and increased responses to ozone observed in obese mice. *Appl. Physiol.* **105**: 1127-1133.
- 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., Brett, C. M. and Giacomini, K. M. 2007.** Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J. Clin. Invest.* **117**:1422-1431.

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

Silver, D. L. and Tall, A. R. 2001. The cellular biology of scavenger receptor class B type I. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**: 497-504.

Silver, D. L., Wang, N., Xiao, X. and Tall, A. 2001. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type I results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J. Biol. Chem.* **276**: 25287-25293.

Sobal, G., Menzel, J. and Sinzinger, H. 2000. Why is glycated LDL more sensitive to oxidation than native LDL? A comparative study. Prostaglandins Leukot. *Essent. Fatty Acids* **63**: 177-186.

Song, X. M., Fiedler, M., Galuska, D., Ryder, J. W., Fernström, M., Chibalin, A. V., Wallberg-Henriksson, H., Zierath, J. R. 2002. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside treatment improves glucose homeostasis in insulin-resistant diabetic (ob/ob) mice. *Diabetologia* **45**: 56-65.

Spencer-Jones, N. J., Snieder, D. G., Perks, U., Swaminathan, R., Spector, T. D., Carter, N. D. and O'Dell, S. D. 2006. AMP-kinase $\alpha 2$ subunit gene PRKAA2 variants are associated with total cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol and high-density lipoprotein-cholesterol in normal women. *J. Med. Genet.* **43**: 936-942.

Srivastava, R. A., 2003. Scavenger receptor class B type I expression in murine brain and regulation by estrogen and dietary cholesterol. *Neurol. Sci.* **210**: 11-18.

Steinberg, D. and Witztum, J. L. 2010. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**: 2311-2316.

Stumvoll, M., Nurjhan, N., Perriello, G., Dailey, G. and Gerich, J. E. 1995. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **333**: 550-554.

Sun, W., Lee, T. S., Zhu, M., Gu, C., Wang, Y., Zhu, Y. and Shyy, J. Y. 2006. Statins activate AMP-activated protein kinase in vitro and in vivo. *Circulation* **114**: 2655-2662.

Swarnakar, S., Temel, R. E., Connelly, M. A., Azhar, S. and Williams, D. L. 1999. Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester. *J. Biol. Chem.* **274**: 29733-29739.

Theodoropoulou, S., Kolovou, P. E., Morizane, Y., Kayama, M., Nicolaou, F., Miller, J. W., Gragoudas, E., Ksander, B. R. and Vavvas, D. G. 2010. Retinoblastoma cells are inhibited by aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) partially through activation of AMP-dependent kinase. *FASEB J.* **24**: 2620-2630.

Tomimoto, A., Endo, H., Sugiyama, M., Fujisawa, T., Hosono, K., Takahashi, H., Nakajima, N., Nagashima, Y., Wada, K., Nakagama, H. and Nakajima, A. 2008.

Metformin suppresses intestinal polyp growth in ApcMin/+ mice. *Cancer Sci.* **11**: 2136-2141.

Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G., Thomazy, V. A. and Evans, R. M. 1998. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL *Cell* **93**: 241-252.

Tran, T. T., Poirier, H., Clement, L., Nassir, F. and Pellers, M. M. 2011. Luminal lipid regulates CD36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis. *J. Biol. Chem.* **286**: 25201-25210.

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.* **6**: 253-270.

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

Wang, W., and Guan, K. L. 2009. AMP-activated protein kinase and cancer. *Acta Physiol. (Oxf)* **196**: 55-63.

Webb, N. R., Connell, P. M., Graf, G. A., Smart, E. J., de Villiers, W. J., de Beer F. C. and van der Westhuyzen D. R. 1998. SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 15241-15248.

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

Wojcicka, G., Jamroz-Wisniewska, A., Horoszewicz, K. and Beltowski, J. 2007. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. **61**:736-759.

Wong, A. K., Howie, J., Petrie, J. R. and Lang, C. C. 2009. AMP-activated protein kinase pathway: a potential therapeutic target in cardiometabolic disease. *Clin. Sci.* **116**: 607-620.

Wong, J., Quinn, C. M., QUINN and Brown, A. J. 2006. SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR. *Biochem. J.* **400** : 485-491.

Yang, J., Goldstein, J. L., Hammer, R. E., Moon, Y. A., Brown M. S. and Horton, J. D. 2001. Decreased lipid synthesis in livers of mice with disrupted Site-1 protease gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 13607-13612.

- Yesilaltay, A., Daniels, K., Pal, R., Krieger, M. and Kocher, O. 2009.** Loss of PDZK1 causes coronary artery occlusion and myocardial infarction in Paigen diet-fed apolipoprotein E deficient mice. *PLoS ONE* 4: e8103.
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J. and Lisheng, L. 2004.** Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): Case-control study. *Lancet* 364: 937-952.
- Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R. and Tontonoz, P. 2009.** LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 325: 100-104.
- Zenimaru, Y., Takahashi, S., Takahashi, M., Yamada, K. Iwasaki, T., Hattori, H., Imagawa, M., Ueno, M., Suzuki, J. and Miyamori, I. 2008.** Glucose deprivation accelerates VLDL receptor-mediated TG-rich lipoprotein uptake by AMPK activation in skeletal muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368: 716-722.
- Zhang, X., Moor, A. N., Merkler, K. A., Liu, Q. and McLean, M. P. 2007.** Regulation of alternative splicing of liver scavenger receptor class B gene by estrogen and the involved regulatory splicing factors. *Endocrinology* 148: 5295-5304.
- Zhang, Y. and Wahl, L. M. 2006.** Synergistic enhancement of cytokine-induced human monocyte matrix metalloproteinase-1 by C-reactive protein and oxidized LDL through differential regulation of monocyte chemotactic protein-1 and prostaglandin E2. *J. Leukoc. Biol.* 79: 105-113.
- Zhao, C. and Dahlman-Wright, K. 2010.** Liver X receptor in cholesterol metabolism. *Endocrinology* 204: 233-240.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., John Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Nicolas Musi, N., Hirshman, M., F., Goodyear, L. J. and Moller, D. E. 2001.** Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108: 1167-1174.