

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES DE LA VIE  
ET DE LA SANTÉ

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Présentée par

Régis SALADIN

**Régulation de gènes impliqués dans  
l'athérosclérose et l'obésité :**

**Rôle des facteurs nutritionnels, hormonaux et  
pharmacologiques sur la régulation des gènes de  
l'apolipoprotéine A-I, du PPAR $\alpha$  et de l'ob.**

Soutenue le 14 Février 1996

devant le jury composé de :



Prof. A. Verbert	Université de Lille I
Dr. M. Guerre-Millo	Institut Biomédical des Cordeliers, Paris
Dr. P. Grimaldi	Université de Nice-Sophia Antipolis
Prof. J.C. Fruchart	Université de Lille II
Dr. B. Staels	Institut Pasteur de Lille
Dr. V. Laudet	Institut Pasteur de Lille

Ce travail a été réalisé sous la direction des Drs. Staels et Auwerx, au LBRE, dans le Département d'Études des Lipides et Lipoprotéines de l'Institut Pasteur de Lille, Unité INSERM 325, dirigée par le professeur J.C. Fruchart.

*A toute ma famille,  
A Emmanuelle,*

*Au commencement, il y eut la genèse de la planète BIOMOL manoeuvrée par le créateur, le Prof. J.C. Fruchart. Pour finir de façonner cette planète, il eut l'idée d'y incorporer une molécule estudiantine. Je fus alors recruté. Monsieur le professeur Fruchart, je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir permis d'intégrer le monde de la recherche au sein de votre laboratoire. Vous me faites aujourd'hui l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.*

*Je voudrais également sincèrement remercier les Drs Laine et Vu Dac, pour leur gentillesse et pour avoir guider mes premiers pas dans la recherche.*

*La planète BIOMOL prit, comme toute les planètes, son essor et sa prospérité, avec l'arrivée de nouveaux résidents. Aux Drs Staels et Auwerx, je tiens à vous témoigner toute ma gratitude pour m'avoir façonné en futur chercheur, même si ce fut parfois un peu dur. A travers votre rigueur et votre compétence scientifique, j'ai pu acquérir un début d'expérience dans le domaine scientifique. Je vous remercie également pour la justesse de vos critiques qui m'ont permis de rédiger ce manuscrit.*

*En ce jour, mes pensées vont à toutes les techniciennes qui ont pu, au cours de mes quatre années de présence au SERLIA m'épauler, et que je tiens à remercier aujourd'hui : Zoulika, Eve, Marie-Joelle, Annie, Delphine et Odile.*

*Je remercie tous les membres du labo, pour leur gentillesse et pour l'amitié qu'ils ont pu me témoigner lors de ces quatre années. Ces remerciements s'étendent à tous les membres du SERLIA, au contact desquels j'aurai passé d'excellents moments. Je ne citerais personne, de peur de me faire engue... par ceux que j'aurai pu oublier.*

*Dr Guerre-Millo, notre collaboration fût prolifique, et rondement mené. Ce fût un plaisir de travailler avec vous. Je tiens à vous remercier pour m'avoir guidé dans les corrections de ce manuscrit. Vous avez bien voulu accepter d'être rapporteur de ce travail. Je vous prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.*

*Dr Grimaldi, vous avez accepté d'être rapporteur de ce travail. Je vous prie de recevoir l'expression de mes sincères remerciements.*

*Dr Laudet, vous avez accepté de juger ce travail. Je vous prie de recevoir l'expression de ma très grande reconnaissance.*

*Enfin, Prof. Verbert, vous avez assisté au début de ma carrière estudiantine, il y a 9 ans, déjà; il était donc légitime que vous assistiez à sa fin. Aujourd'hui, vous me faites l'honneur de présider cette thèse, veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.*

# **ABBRÉVIATIONS**

- ACTH : Adrenocorticotropic Hormone  
ACO: Acyl CoA oxidase  
AMPc : Adenosine monophosphate cyclique  
apo : Apolipoprotéine  
AR : Androgen Receptor  
ARNm : Acide Ribonucléique messager  
ARP1 : Apolipoprotein Regulatory Protein  
BMI : Body Mass Index  
CCK : Cholecystokinine  
CE : Cholesterol Ester  
CETP : Cholesterol Ester Transfer Protein  
CL : Cholesterol libre  
CPE : Carboxypeptidase E  
EAR : Erb-a Related Protein  
ER : Estrogen Receptor  
ERAP : Estrogen Receptor Related Protein  
GLP-1 : Glucagon Like Peptide 1  
GME : Glucocorticoid Modulatory Element  
GR : Glucocorticoid Receptor  
HBP : HDL Binding Protein  
HDL : High Density Lipoprotein  
HMGCoA: 3-hydroxy-3-methyl glutaryl Coenzyme A  
HNF4 : Hepatocyte Nuclear Factor  
HRE : Hormone Responsive Element  
HTGL : Hepatic Triglyceride Lipase  
IDL : Intermediate Density Lipoprotein  
Kb : Kilobase  
LCAT : Lecithin:cholesterol Acyltransferase  
LDL : Low Density Lipoprotein  
LDL-R : LDL-receptor  
LH : Lateral Hypothalamus  
LPL : Lipoprotein Lipase  
LRP : LDL-receptor Related Protein  
NIDDM : Non Insulino Dependant Diabète Mellitus  
NPY : Neuropeptide Y

**PPAR :** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  
**PPRE :** Peroxisome Proliferator Response Element  
**PUFA :** Polyunsaturated Fatty Acid  
**PVN :** Paraventricular Nucleus  
**RAR :** Retinoic Acid Receptor  
**RMR :** Resting Metabolic Rate  
**RXR :** 9-cis retinoic acid receptor  
**SR-BI :** Class B Scavenger Receptor  
**SRE :** Sterol Regulatory Element  
**SREB :** Sterol Regulatory Element Binding protein  
**TG :** Triglycéride  
**TR :** Thyroid hormone Receptor  
**TRE :** Thyroid Responsive Element  
**UCP :** Uncoupling Protein  
**VLDL :** Very Low Density Lipoprotein  
**VMH :** Ventromedian Hypothalamus  
 **$\alpha$ -MSH :**  $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone

# SOMMAIRE

RÉSUMÉ	1
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	2
A. LE MÉTABOLISME LIPOPROTÉIQUE ET SA RÉGULATION	4
A.1. Métabolisme lipoprotéique	5
A.1.1 Classification des lipoprotéines	5
A.1.1.1. Classification selon la densité hydratée	5
A.1.1.2. Classification immunologique	6
A.1.2. Métabolisme des lipoprotéines	7
A.1.2.1. Les chylomicrons	7
A.1.2.2. VLDL, LDL, HDL	7
A.1.2.3. HDL	8
A.1.2.3.1. Les apolipoprotéines des HDL	9
L'apolipoprotéine A-I	9
L'apolipoprotéine A-II	11
A.1.2.3.2. Le métabolisme des HDL	12
A.2. Régulation du métabolisme lipoprotéique	15
A.2.1. Régulation par les facteurs nutritionnels	15
A.2.1.1. Régulation par le cholestérol	15
A.2.1.2. Régulation par les carbohydrates	16
A.2.1.3. Régulation par les acides gras	18
Régulation par les acides gras saturés	18
Régulation par les acides gras monoinsaturés	19
Régulation par les acides gras polyinsaturés	21
A.2.2. Régulation par les facteurs hormonaux	23
A.2.2.1. Hormones agissant par récepteurs nucléaires	25
Régulation par les hormones thyroïdiennes	25
Régulation par les hormones stéroïdiennes	28
Régulation par les corticostéroïdes	28
Régulation par les oestrogènes	29
Régulation par les rétinoïdes	31
Régulation par les récepteurs nucléaires orphelins	32
A.2.2.2. Hormones agissant par des récepteurs membranaires	33
Régulation par l'insuline	33
Régulation par le glucagon	35

<b>A.2.3. Régulation par les agents pharmacologiques</b>	<b>35</b>
Régulation par les statines	35
Régulation par les fibrates	36
 <b>B. L'OBÉSITÉ</b>	 38
<b>B.1. Aspects cliniques de l'obésité</b>	<b>38</b>
<b>B.1.1. Méthodes</b>	<b>38</b>
<b>B.1.2. Traitement de l'obésité</b>	<b>39</b>
<b>B.1.3. Les modèles animaux d'obésité</b>	<b>40</b>
<b>B.2. Le métabolisme énergétique</b>	<b>42</b>
<b>B.2.1. Aspect physiologique du métabolisme énergétique</b>	<b>42</b>
<b>B.2.2. La dépense énergétique</b>	<b>44</b>
<b>B.2.3. L'apport énergétique</b>	<b>46</b>
<b>B.3. Mécanismes de régulation de la prise de nourriture</b>	<b>48</b>
<b>B.3.1. Modèles d'étude</b>	<b>49</b>
<b>B.3.2. Régulation de la prise de nourriture</b>	<b>52</b>
<b>B.4. Aspect génétique de l'obésité</b>	<b>54</b>
<b>B.4.1. Génétique et obésité humaine</b>	<b>54</b>
<b>B.4.2. Modèles animaux d'obésité</b>	<b>56</b>
<b>B.4.2.1. La mutation fat</b>	<b>57</b>
<b>B.4.2.2. La mutation agouti</b>	<b>58</b>
<b>B.4.2.3. La mutation ob</b>	<b>59</b>
 <b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b>	 62
 <b>A. RÉGULATION DU GÈNE DE L'APOLIPOPROTÉINE A-I</b>	 62
<b>A.1. Régulation du gène de l'apolipoprotéine A-I par les glucocorticoïdes</b>	<b>62</b>
<b>A.1.1. Introduction</b>	<b>62</b>
<b>A.1.2. Résultats et discussion</b>	<b>63</b>
<b>A.2. Régulation du gène de l'apolipoprotéine A-I par les fibrates et les acides gras</b>	<b>65</b>
 <b>B. RÉGULATION DU GÈNE DU PPAR</b>	 70
<b>B.1. Introduction</b>	<b>70</b>
<b>B.2. Résultats et discussion</b>	<b>72</b>
 <b>C. RÉGULATION DU GÈNE DE L'ob</b>	 73
<b>C.1. Introduction</b>	
<b>C.2. Résultats et discussion</b>	<b>74</b>

<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b>	<b>77</b>
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>78</b>
<b>LISTE DE PUBLICATIONS</b>	<b>101</b>
<b>PUBLICATION I</b>	
<b>PUBLICATION II</b>	
<b>PUBLICATION III</b>	
<b>PUBLICATION IV</b>	
<b>PUBLICATION V</b>	
<b>PUBLICATION VI</b>	

## RÉSUMÉ

Le but de cette étude était d'étudier les mécanismes par lesquels les facteurs nutritionnels, hormonaux et pharmacologiques, interviennent dans des maladies comme l'athérosclérose et l'obésité, l'hypothèse étant qu'ils exercent leur action en régulant l'expression des gènes clés impliqués dans ces maladies.

Les lipoprotéines de hautes densités (HDL), principalement par l'action de leur principal constituant protéique, l'apolipoprotéine A-I (apo A-I), ont un effet protecteur contre le développement de l'athérosclérose. Les HDL sont impliquées dans le transport inverse du cholestérol, consistant à capter le cholestérol excédentaire des cellules périphériques pour le ramener vers le foie où il est catabolisé. Les glucocorticoïdes provoquent une augmentation des taux plasmatiques de HDL chez l'homme et le rat. Chez le rat, nous avons montré que cette augmentation est corrélée avec une induction de la transcription hépatique du gène de l'apo A-I, ce qui pourrait, en partie, expliquer l'effet des glucocorticoïdes sur les HDL.

Par contre, les fibrates, agents pharmacologiques hypolipémiants, et certains acides gras, provoquent chez le rat une diminution des taux plasmatiques de HDL. Nous avons montré que cette diminution s'accompagne d'une réduction de la transcription hépatique du gène de l'apo A-I. Les fibrates et les acides gras activent les facteurs de transcription PPARs, membres récemment clonés de la super-famille des récepteurs nucléaires d'hormones. Le PPAR $\alpha$ , exprimé au niveau hépatique, médie l'effet des fibrates et des acides gras sur les gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. Nous avons montré que l'expression de ce gène pouvait être régulé de manière transcriptionnelle par les glucocorticoïdes. *In vitro*, en présence d'un activateur de PPAR (fibrates ou acides gras) et d'un inducteur de PPAR (glucocorticoïdes), l'effet sur les gènes cibles du PPAR $\alpha$ , est plus prononcé.

La mutation du gène *ob*, dont le produit, la leptine, agit comme facteur de satiété et régule le métabolisme énergétique, intervient dans le développement de l'obésité chez la souris. Chez le rat, nous avons montré que l'administration de glucocorticoïdes provoque une baisse de prise de poids et de nourriture; en parallèle, une augmentation de l'expression du gène *ob* est observée. De plus, l'expression du gène *ob* est régulée par la nutrition de l'animal. L'expression de ce gène est induite par la prise de nourriture, cet effet étant médié par l'insuline.

L'ensemble de ces résultats montre que l'effet des facteurs nutritionnels, hormonaux et pharmacologiques peut s'expliquer, en partie, par une action sur l'expression de gènes clés impliqués dans l'athérosclérose et l'obésité.

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

L'athérosclérose et l'obésité sont deux problèmes majeurs de santé publique. Ces maladies sont toutes deux associées à des facteurs environnementaux et génétiques. L'obésité se traduit par une accumulation exagérée de lipides dans la masse adipeuse, phénomène dépendant d'un désordre de la balance énergétique. L'athérosclérose se traduit par une accumulation de cholestérol au niveau des artères, ce qui entrave le flux sanguin et provoque des accidents cardio- ou cérébrovasculaires. Au coeur de ces deux maladies, on retrouve donc un désordre du métabolisme lipidique.

Dans le développement de l'obésité, les facteurs environnementaux et génétiques responsables de la maladie, provoquent un désordre du métabolisme lipidique et lipoprotéique, provoquant une hyperlipémie. C'est dans ce sens, que l'obésité affecte les facteurs de risque prédisposant à l'athérosclérose (Keys, 1980). En particulier, l'obésité est associée avec un taux élevé de cholestérol plasmatique total. Cette augmentation est due à une augmentation des concentrations plasmatiques des lipoprotéines de très basses densités, riches en triglycérides (VLDL et IDL) (Peeples et al., 1989) et d'une augmentation du transport du cholestérol par les lipoprotéines de basses densités (LDL) (Grundy et al., 1979). De plus, l'obésité s'accompagne d'une diminution des concentrations plasmatiques des lipoprotéines de hautes densités, les HDL (Garrison et al., 1978). Une augmentation des concentrations plasmatiques en cholestérol et triglycérides, accompagnée d'une baisse des concentrations plasmatiques en HDL est associée au développement de l'athérosclérose (Miller et al., 1977).

Depuis quelques années, des progrès considérables ont été réalisés dans la découverte des facteurs génétiques impliqués dans l'athérosclérose et l'obésité. La recherche actuelle dans ce domaine s'oriente vers la compréhension des mécanismes moléculaires régissant l'expression des gènes impliqués dans ces maladies. Comprendre ces mécanismes pourrait permettre d'envisager la mise au point de nouvelles thérapies.

Dans l'athérosclérose et l'obésité, une diminution des taux de HDL au niveau plasmatique est observée. L'apolipoprotéine A-I est le principal constituant protéique de ces lipoprotéines. Les taux plasmatiques de cette apolipoprotéine sont négativement corrélés au risque de développement de l'athérosclérose (Rubin et al., 1991; Schultz et al., 1993). A la vue de cet effet protecteur de l'apolipoprotéine A-I, il apparaît qu'étudier la régulation de l'expression de son gène relève d'une grande importance. C'est pourquoi, nous avons étudié dans un premier temps, la régulation de l'expression du gène de l'apolipoprotéine A-I par les facteurs hormonaux (les corticostéroïdes), nutritionnels (les acides gras) et pharmacologiques (les fibrates : agents pharmacologiques hypolipémiants).

Concernant les acides gras et les fibrates, il a été montré récemment que ces produits activaient un nouveau facteur de transcription, appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires d'hormones, le Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR). Les PPARs ont de nombreux effets sur le métabolisme lipidique, en régulant l'expression de plusieurs gènes clés impliqués dans ce métabolisme. En particulier, le PPAR $\alpha$ , fortement exprimé dans le foie, pourrait moduler l'expression des gènes de certaines apolipoprotéines, comme cela a déjà été montré pour le gène de l'apolipoprotéine A-I (Vu Dac et al., 1995). Au niveau hépatique, le PPAR $\alpha$  semble donc être un médiateur de l'effet des acides gras et des fibrates sur les gènes cibles. L'absence de réponse à ces produits sur les gènes cibles chez des souris où le gène du PPAR $\alpha$  a été muté par recombinaison homologue renforce cette hypothèse (Lee et al., 1995). Du fait du rôle du PPAR $\alpha$  sur le métabolisme lipidique, il nous est apparu essentiel dans un deuxième temps d'étudier la régulation de l'expression de son gène au niveau hépatique.

Le PPAR $\gamma$ , un autre membre de la famille des PPARs, médie l'effet des fibrates et des acides gras au niveau du tissu adipeux. Ce facteur intervient dans la différenciation adipocytaire (Tontonoz et al., 1995), et il est possible de spéculer sur un rôle éventuel de ce facteur dans le développement de l'obésité. Si ce rôle n'est pas encore clair pour le gène du PPAR $\gamma$ , un autre gène récemment cloné, le gène *ob*, est responsable du développement de l'obésité chez la souris (Friedman et al., 1991). Des souris possédant ce gène muté deviennent hyperphagiques et obèses (Coleman et al., 1978). Chez la souris, le produit de ce gène, la leptine, agit comme facteur de satiété et comme régulateur de la balance énergétique en provoquant une diminution de prise de nourriture et une baisse de prise de poids (Halaas et al., 1995). Ces résultats font du gène de l'*ob* un candidat très sérieux en tant que facteur génétique impliqué dans le développement de l'obésité. C'est pourquoi dans un troisième temps, nous avons étudié la régulation du gène *ob* par les facteurs nutritionnels et hormonaux.

Nos résultats concernant l'effet des facteurs nutritionnels, hormonaux ou pharmacologiques sur l'expression de ces trois gènes, seront présentés après avoir rappelé les données bibliographiques se rapportant au métabolisme lipoprotéique et à l'obésité.

## A. LE MÉTABOLISME LIPOPROTÉIQUE ET SA RÉGULATION

Les lipides (acides gras, triglycérides, phospholipides, cholestérol et esters de cholestérol) sont des composés essentiels pour le corps, impliqués dans la constitution des membranes, la synthèse des hormones stéroïdiennes et de la bile, ou encore servant comme source et réserve d'énergie. Même si ces composés sont indispensables, un taux élevé de lipides dans le sang est corrélé avec le développement de l'athérosclérose, maladie au cours duquel un des principaux lipides, le cholestérol, s'accumule dans les artères, entravant le flux sanguin.

Les lipides sont des composés très peu solubles dans l'eau, qui ne peuvent être acheminés dans le plasma sous forme libres. Ils n'existent qu'associés à des particules lipoprotéiques que l'on appelle lipoprotéines. Les lipoprotéines constituent dans le plasma un système dynamique assurant le transport des lipides depuis leur lieu de sécrétion intestinale ou hépatique jusqu'aux tissus où ils seront utilisés. Ce sont des particules sphériques comportant un noyau hydrophobe, composé de triglycérides et d'esters de cholestérol en proportions variables, et une enveloppe hydrophile, formée de composants polaires : phospholipides, cholestérol libre et des protéines spécifiques, les apolipoprotéines (Mahley et al., 1984).

Dans le cadre de l'étude contre l'athérosclérose, il est important de connaître le métabolisme des lipoprotéines et d'étudier les mécanismes régulant ce métabolisme. Parmi les lipoprotéines, la lipoprotéine de hautes densités (HDL) a été, et demeure largement étudiée, du fait de sa capacité à effectuer un transport particulier du cholestérol, le transport inverse du cholestérol. Au cours de ce transport, le cholestérol excédentaire est capté sur les tissus périphériques par les HDL, et ramené au foie, par différentes voies, où il sera dégradé. Des études cliniques ont montré qu'un taux plasmatique faible de HDL était corrélé avec un risque accru d'athérosclérose (Gordon et al., 1989).

Les HDL peuvent être distinguées selon leur composition en apolipoprotéines, en particulier selon leur composition en apo A-I et A-II, les apolipoprotéines majeures des HDL. Ainsi, il est possible d'isoler des particules lipoprotéiques contenant les apo A-I et A-II, nommées LpAI:AII et celles ne contenant que l'apo A-I, les LpAI (Leroy et al., 1995). Les taux plasmatiques de LpAI sont positivement corrélés à une protection contre le développement de l'athérosclérose (Fruchart et al., 1994). De nombreux travaux montrent que les taux plasmatiques de HDL, sont en partie dépendantes de l'expression du gène de ces deux apolipoprotéines. Ainsi, comprendre les mécanismes qui régulent l'expression de ces gènes, pourrait donc relever d'une grande importance.

Nous rappelerons dans ce chapitre les données relatives au métabolisme lipoprotéique, en s'intéressant plus particulièrement au métabolisme des HDL. Ensuite, nous passerons en revue les mécanismes connus ayant un effet sur le métabolisme des lipoprotéines.

## A.1. Métabolisme lipoprotéique

### A.1.1. Classification des lipoprotéines

Il existe une grande diversité dans les lipoprotéines, ce qui rend leur classification exacte difficile. Néanmoins, différentes techniques ont été utilisées afin de classer les lipoprotéines. Les deux grands types de classification sont physicochimiques (densité hydratée, mobilité électrophorétique, taille), et depuis quelques années, immunologiques, ce qui permet de séparer les lipoprotéines selon leur composition en apolipoprotéines (Duriez et Fruchart, 1984).

#### A.1.1.1. Classification selon la densité hydratée

La classification classique (tableau 1) des lipoprotéines, selon leur densité hydratée (Havel et Kaine, 1989, Luc et al., 1991), est présentée Table 1. La séparation par ultracentrifugation sur gradient de densité permet de définir plusieurs classes, par ordre de densités croissantes : Chylomicrons, VLDL, IDL, LDL et HDL.

LIPOPROTEINE	DENSITÉ	MOBILITÉ ÉLECTRO- PHORÉTIQUE	MASSE (10 <sup>6</sup> Da)	TAILLE (nm)	APOLIPO- PROTÉINES PRINCI- PALES	COMPOSITION (% masse) P;PL/CL; CE:TG
Chylomicrons	< 0.95	origine	> 150	100-1 000	B-β, C, E	2, 5, 1, 2, 90
VLDL	0.95-1.006	pré-β <sub>a</sub>	5-130	30-70	B, C, E	10, 16, 7, 13, 54
IDL (LDL I)	1.006-1.019	pré-β <sub>a</sub> , β <sub>a</sub>	4	25	B, C, E	17, 20, 9, 34, 20
LDL	1.019-1.063	β <sub>a</sub>	3	20	8	23, 21, 11, 41, 4
HDL 2	1.063-1.125	α <sub>1</sub>	0,4	10	A-I, A-II	42, 35, 5, 13, 5
HDL 3	1.125-1.21	α <sub>2</sub>	0,2	8	A-I	72, 20, 2, 5, 1
VHDL	> 1.21	α <sub>2</sub>	0,15	7	A-I	72, 20, 2, 5, 1
L <sub>p</sub> (a)	1.055-1.12	pré-β <sub>a</sub>	5,5	25	(α), β	34, 18, 9, 36, 3

P : protéines, PL : phospholipides, CL : cholestérol libre, CE : cholestérol esterifié, TG : Triglycérides.

Tableau 1 : Caractéristiques des lipoprotéines  
(Luc et al., 1991)

Les chylomicrons (densité < 0,95 g/ml), représentent la principale forme de transport des triglycérides d'origine alimentaire, de l'intestin vers les autres tissus. Du fait de leur basse densité, ils flottent spontanément dans le serum isolé. Ces particules comportent environ 90 % de triglycérides, et seulement 1 à 2 % de protéines. La partie

protéique est essentiellement constituée par les apo B-48, A-I, A-IV et C (Luc et al., 1991).

Les lipoprotéines de très basses densités (VLDL) ( $0,95 < \text{densité} < 1,006 \text{ g/ml}$ ), principalement synthétisées dans le foie, permettent le transport des triglycérides du foie vers les tissus périphériques, lieux de leurs utilisations. Les protéines représentent 5 à 10 % de leur masse totale, et ce sont principalement les apo B-100, E et C (Luc et al., 1991). Les chylomicrons et les VLDL vont subir une lipolyse, sous l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) et se chargent en esters de cholestérol, qu'elles échangent avec les HDL, par l'action de la CETP. À la suite de ces modifications, le VLDL, se transforme en lipoprotéine de densités intermédiaires (IDL), encore appelé VLDL-remnant ( $1,006 < \text{densité} < 1,019 \text{ g/ml}$ ).

Sous l'action de la lipase hépatique (HTGL), les IDL continuent à subir une lipolyse. Ces lipoprotéines deviennent alors des lipoprotéines de basses densités (LDL) ( $1,019 < \text{densité} < 1,063 \text{ g/ml}$ ). Les LDL sont considérées comme les principaux transporteurs de cholestérol du foie vers les tissus périphériques. Elles sont très riches en cholestérol (60 à 70 % des lipides), et contiennent environ 25 % de protéines, essentiellement l'apo B-100.

Les lipoprotéines de hautes densités (HDL) ( $1,063 < \text{densité} < 1,21 \text{ g/ml}$ ), semblent avoir trois origines : l'intestin et le foie, où elles sont synthétisées (Eisenberg et al., 1984), la lipolyse des chylomicrons et des VLDL (Tall et Small, 1978) et enfin l'association directe des apolipoprotéines et des phospholipides (Hara et Yokohama, 1991). Les HDL sont riches en cholestérol et en phospholipides (respectivement 40 et 50 % des lipides) et sont composés pour 50 % de protéines, dont les apo A-I, A-II et A-IV, C-I, C-II et E. Chez l'homme, les apolipoprotéines majeures de cette fraction sont les apo A-I et A-II (Luc et al., 1991).

#### A.1.1.2. Classification immunologique

Le métabolisme des lipoprotéines est déterminé par leur composition en apolipoprotéines. C'est pourquoi, ces dernières années, une séparation sur la base des apolipoprotéines dominantes des lipoprotéines a été établie. La composition en apolipoprotéines de ces particules détermine leur métabolisme. Ainsi, il est possible de déterminer deux grandes classes de particules lipoprotéiques : les lipoprotéines contenant majoritairement de l'apo B, qui représentent les fractions VLDL, IDL et LDL, et celles contenant majoritairement des apo A, qui représente la fraction HDL.

Les lipoprotéines contenant de l'apo B, peuvent à leur tour être séparées en sous-classes, selon la présence ou non d'autres apolipoprotéines. Ainsi, ont été caractérisées les particules LpB, ne contenant que de l'apo B; les particules LpB:E, contenant de l'apo

B et de l'apo E; les LpB:CIII; contenant les apo B et CIII; les LpB:CIII:E, contenant des apo B, C-III et E, etc... (Alaupovic et al., 1988).

Les lipoprotéines contenant les apo A, peuvent être séparées en deux sous classes majeures : les LpAI, qui contiennent uniquement l'apo A-I et les LpAI:AII contenant les apo A-I et A-II (Cheung et Albers, 1984; Fruchart et al., 1993). Deux autres particules contenant des apo A ont également été isolées. Il s'agit de la LpAIV, ne contenant que de l'apo A-IV, et la LpAII, ne contenant que de l'apo A-II, isolée chez des patients atteint de la maladie de Tangier (Duchateau et al., 1993).

### A.1.2. Métabolisme des lipoprotéines

#### A.1.2.1. Les chylomicrons

Les chylomicrons sont synthétisés par les entérocytes et transportent les graisses d'origine alimentaire vers les tissus utilisateurs, comme le muscle, ou vers les sites de stockage comme le tissu adipeux. Les chylomicrons naissants contiennent de l'apo B-48, qui est nécessaire à leur structure, et des apo A-I, A-IV et C. Au cours du transport dans la lymphé et dans le flot sanguin, les chylomicrons se chargent en apo E et en apo C, qu'ils échangent contre les apo A-I et A-IV aux HDL. Ces particules subissent rapidement une lipolyse sous l'action de la lipoprotéine lipase (LPL), en présence de l'apo C-II, son cofacteur indispensable. Après lipolyse, les chylomicrons donnent naissance à des résidus de chylomicrons, les remnants, captés par un récepteur spécifique, le récepteur hépatique apo E (Herz et al., 1988). Ce récepteur pourrait être le LDL-receptor-Related Protein (LRP), car ce récepteur capte préférentiellement les lipoprotéines riches en apo E au niveau hépatique (Kowal et al., 1989).

#### A.1.2.2. VLDL, IDL et LDL

Les VLDL sont synthétisées selon l'état métabolique ou nutritionnel au niveau du foie. Dans le foie, les triglycérides endogènes, issus de la lipogenèse hépatique, servent de précurseurs à la synthèse de ces lipoprotéines. Les triglycérides peuvent également provenir des chylomicrons remnants captés par le foie, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent.

Quelque soit leur origine, les triglycérides sont alors associés à des apolipoprotéines, principalement de l'apo B-100, dont la présence est indispensable à la sécrétion de ces lipoprotéines. D'autres apolipoprotéines, C et E, également synthétisées par le foie participent à la constitution des VLDL naissantes. Une fois sécrétées, les VLDL sont hydrolysées par la LPL selon un mécanisme analogue aux chylomicrons. Les

résidus des VLDL, les IDL (VLDL-remnants), subissent à leur tour la lipolyse sous l'action de la lipase hépatique (HTGL) pour être transformées en LDL.

Les LDL dont le rôle essentiel est de fournir le cholestérol aux tissus périphériques, sont captées par les récepteurs B/E, encore appelés récepteur aux LDL (LDL-R), présent dans le foie et les tissus périphériques (Goldstein et Brown, 1986). Le LDL-R peut également capter les IDL, grâce à la présence d'apo E à la surface de ces lipoprotéines.

Il existe une autre voie métabolique impliquée dans le catabolisme des LDL faisant intervenir les macrophages. Ces cellules possèdent un récepteur appelé "scavenger", dont le rôle serait d'épurer le plasma et les tissus de LDL modifiées. En cas d'hyperlipémie, cette voie pourrait donner naissance à un excès de dépôts de cholestérol dans différents tissus (Brown et Goldstein, 1990).

#### A.1.2.3. HDL

Les HDL sont impliquées dans le transport inverse du cholestérol. Ce transport consiste à prendre le cholestérol excédentaire des tissus périphériques pour le ramener vers le foie, où il sera dégradé ou excrété. Les HDL naissantes, chargées en cholestérol libre, rentrent dans le courant sanguin. Ces HDL naissantes vont alors être modifiées par la lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT), qui transforme le cholestérol libre en cholestérol estérifié, lequel migre au centre des particules, leur conférant une forme sphérique (HDL3)(Figure 1). Ces particules continuent à s'enrichir en cholestérol estérifié et deviennent plus grandes (HDL2) (Eisenberg et al., 1984).

A ce stade, les HDL2 ont 3 voies principales pour libérer leur cholestérol. D'abord, par l'action de la cholesterol ester transfer protein (CETP), qui échange une partie du cholestérol estérifié des HDL2 vers les VLDL, LDL et IDL, qui, en retour, enrichissent les HDL2 en triglycérides. Le cholestérol estérifié transféré aux particules contenant de l'apo B, peut être capté par le foie via le LDL-R (Figure 1). Ensuite, d'autres auteurs ont suggéré l'existence d'une protéine membranaire qui pourrait fixer les HDL (Tozuka et Fidge, 1989; Oram et al., 1990; Barbaras et al., 1990). Cette hypothèse a été récemment confirmée, puisque le récepteur aux HDL a été identifié (Acton et al., 1996). Ce récepteur, appelé SR-BI (class B scavenger receptor) appartient à la famille des récepteurs scavenger et permet de capter efficacement le cholestérol des HDL (Acton et al., 1996) (Figure 1). Enfin, par action de la lipase hépatique, une partie des triglycérides des HDL2 peut être captée par le foie (Deckelbaum et al., 1986). Après action de cette enzyme, les HDL2 se transforment en HDL3 qui peuvent alors recommencer un cycle.

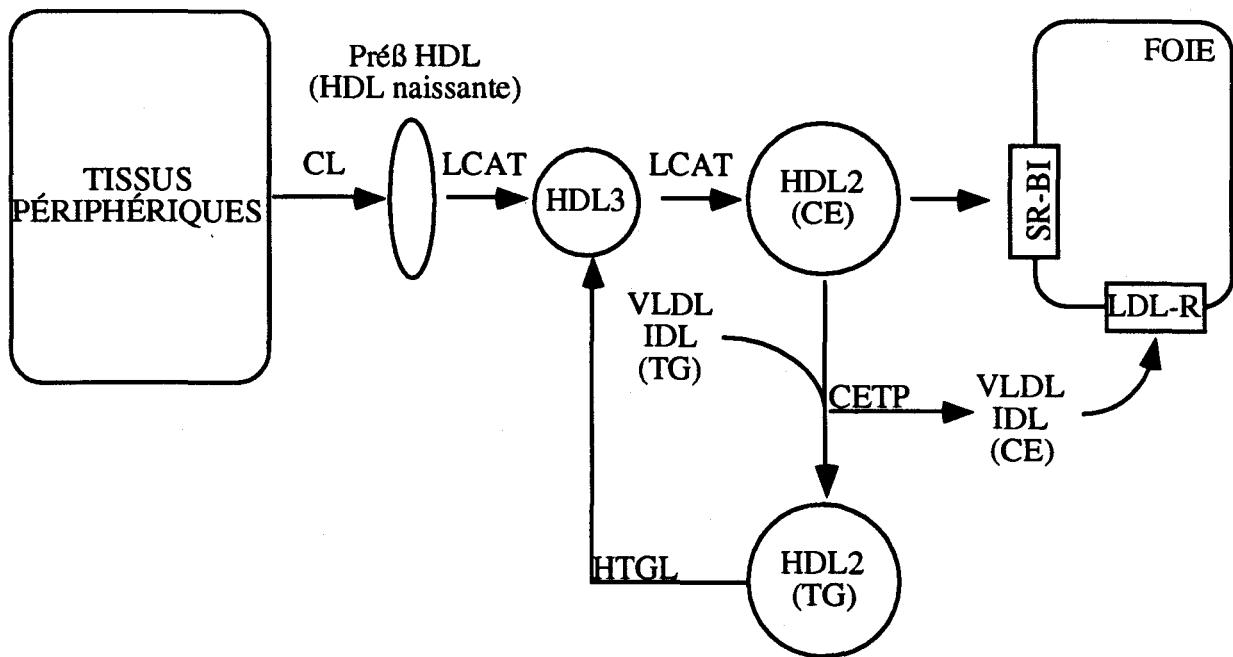


Figure 1 : Métabolisme des HDL

CL : cholestérol libre; CE : cholestérol estérifié; HDL : High Density Lipoprotein; VLDL : Very Low Density Lipoprotein; IDL : Intermediate Density Lipoprotein; CETP : Cholesterol Ester Transfer Protein; LCAT : lecithin:cholesterol acyltransferase; LDL-R : Récepteur aux LDL; SR-BI : Scavenger Receptor B class.

#### A.1.2.3.1. Les apolipoprotéines des HDL

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les apolipoprotéines participent aux différentes étapes du métabolisme des lipoprotéines. Elles interviennent dans la sécrétion et le transport des lipides, dans les interactions lipoprotéines/récepteurs, ainsi que dans la régulation de l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines. De plus, elles sont essentielles à la structure de ces lipoprotéines.

Bien qu'il existe de nombreuses apolipoprotéines, nous porterons plus particulièrement notre attention sur les deux apolipoprotéines majeures des HDL, les apolipoprotéines A-I et A-II.

##### - L'apolipoprotéine A-I

L'apo A-I est principalement présente dans les HDL, où elle représente environ 70 % des protéines de ces lipoprotéines. Elle existe également dans les chylomicrons en période digestive, au moment de la formation de ces lipoprotéines.

### *Synthèse*

Chez l'homme et chez le rat, l'apo A-I possède deux sites majeurs de synthèse : le foie et l'intestin (Elshourbagy et al., 1985; Wu et Windmueller, 1979). Elle est synthétisée sous forme de préproapo A-I, comportant une séquence signal de 18 acides aminés clivée cotraductionnellement. La proapo A-I, qui comporte un prosegment de 6 acides aminés, ainsi produite, est secrétée par l'intestin sur les chylomicrons et par le foie sur les HDL. Elle est alors rapidement transformée dans la lymphe et le plasma en apo A-I mature (Zannis et al., 1983). Chez l'homme, l'apo A-I d'origine intestinale entre dans la circulation associée aux chylomicrons, et, est rapidement transférée aux HDL (Tall et Small, 1978). L'apo A-I d'origine hépatique est synthétisée et secrétée en association avec les HDL naissantes (Eisenberg, 1984).

### *Structure*

Chez l'homme, le gène de l'apo A-I est situé sur le chromosome 11, de même que les gènes des apo C-III et A-IV (Karathanasis et al., 1983). Ces trois gènes sont regroupés sur une zone d'environ 20 Kb. Le gène humain de l'apo A-I, qui code pour un ARNm d'environ 1,1 Kb, comporte 4 exons et 3 introns de même que les gènes des apo A-II, C-II, C-III et E (Karathanasis, 1985). Les apo A-I de l'homme et du rat sont, sous leur forme mature, des polypeptides de 243 et 235 acides aminés respectivement (Brewer et al., 1978; Gordon et al., 1982). L'apo A-I contient plusieurs répétitions de 22 acides aminés. Ces répétitions possèdent une structure amphipatique en hélice  $\alpha$ .

### *Rôle*

La structure en hélice  $\alpha$  de l'apo A-I lui confère sa première propriété, c'est-à-dire de se lier aux lipides. Ceci lui donne un rôle de maintien de la structure des HDL. Outre cette fonction structurale, l'apo A-I est un cofacteur nécessaire à l'activité de la LCAT (Fielding et al., 1972). Cette activité pourrait être due aux hélices  $\alpha$ , car il a été montré que des peptides synthétiques de 22 acides aminés possédant la même structure, sont capables de produire le même effet (Yokohama et al., 1980; Luchoomun et al., 1993). De plus, les LpAI possède une forte capacité à effectuer l'efflux de cholestérol, première étape du transport inverse du cholestérol (Fruchart et al., 1994). Enfin, selon certains auteurs, l'apo A-I permettrait aux HDL d'être reconnues par des récepteurs cellulaires fixant les HDL (HBP) localisés sur la membrane des cellules des tissus périphériques (Oram et al., 1983; Fidge et Nestel, 1985). La partie C-terminale de l'apo A-I interviendrait dans la reconnaissance de ce(s) récepteur(s) (Allan et al., 1993). Chez l'homme, les taux plasmatiques d'apo A-I sont inversement corrélés au risque d'athérosclérose. Dans les souris transgéniques pour l'apo A-I humaine, les taux de HDL sont augmentés. Ces animaux montrent une résistance au développement de l'athérosclérose (Rubin et al., 1991; pour revue, Breslow, 1993). De plus, l'expression de l'apo A-I, dans des souris transgéniques déficientes en apo E et présentant une forte susceptibilité au développement de l'athérosclérose, corrige la pathologie (Plump et al.,

1994; Paszty et al., 1994). Ces résultats confirment le rôle protecteur de l'apo A-I contre le développement de l'athérosclérose.

#### - L'apolipoprotéine A-II

##### *Synthèse*

Chez l'homme, l'apo A-II est associée aux HDL, et représente le deuxième constituant protéique majeur de ces lipoprotéines (environ 25 % des protéines). Elle est principalement exprimée dans le foie et est secrétée en association avec les HDL naissantes. L'apo A-II est synthétisée sous forme de préproapo A-II, comportant 18 acides aminés clivés cotructuellement. La proapo A-II ainsi produite contient un propeptide qui sera clivé à l'intérieur de la cellule (Gordon et al., 1985). Un mécanisme particulier de clivage à l'extérieur de la cellule a également été décrit (Gordon et al., 1985). Le rôle de ce clivage n'a, à notre connaissance, pas encore été élucidé.

##### *Structure*

Le gène de l'apo A-II, situé sur le chromosome 1 (Lackner et al., 1984), a la même structure que le gène de l'apo A-I, c'est-à-dire composé de 4 exons et de 3 introns (Karathanasis, 1985), et code un ARNm de 0,6 Kb environ (Nagashima et al., 1986). Chez l'homme, elle se compose, à l'état mature de deux chaînes polypeptidiques de 77 acides aminés, liées par un pont disulfure, pour un poids moléculaire de 17400 daltons. Par contre, chez le rat, l'apo A-II mature contient 79 acides aminés et se présente sous forme monomérique, du fait de l'absence d'un pont disulfure (Nagashima et al., 1986).

##### *Rôle*

L'apo A-II possède une grande affinité pour les lipides du fait de sa structure amphipatique. Cette affinité est supérieure à celle de l'apo A-I. De ce fait, l'apo A-II peut déplacer l'apo A-I de la surface des HDL et joue donc un rôle structural important (Lagocki et Scanu, 1980; Ikewaki et al., 1995). D'autres fonctions semblent être attribuées à l'apo A-II. En effet, certains auteurs ont suggéré un rôle activateur sur la lipase hépatique à l'apo A-II *in vitro* (Jahn et al., 1983). Cependant, ce résultat est controversé, puisqu'il a été récemment montré *in vivo* que l'apo A-II inhibait l'activité de cette enzyme (Zhong et al., 1994). Ces auteurs suggèrent que l'effet de l'apo A-II dépendrait des conditions physiologiques dans lesquelles la mesure d'activité enzymatique est réalisée. De plus, un rôle inhibiteur sur l'activité de la LCAT est attribué à l'apo A-II (Soutar et al., 1975). Des études épidémiologiques montrent que les HDL contenant les apo A-I et A-II (LpA<sub>I</sub>:A<sub>II</sub>) sont de moins bons protecteurs contre l'athérosclérose que les LpA<sub>I</sub> (Fruchart et al., 1994). L'utilisation des souris transgéniques a permis de confirmer le rôle proathérogène, souvent attribué à l'apo A-II. En effet, des souris transgéniques pour l'apo A-II murine montrent un développement

précoce de l'athérosclérose (Warden et al., 1993; pour revue, Breslow, 1993; Schultz et al., 1993).

#### A.1.2.3.2. Le métabolisme des HDL

Comme nous l'avons brièvement vu dans le chapitre A.1.1.1., les HDL semblent posséder trois origines. 1) D'abord les HDL peuvent être néosynthétisées au niveau du foie. En effet, les apolipoprotéines constitutives des HDL sont synthétisées dans le foie et s'associent aux lipides pour former les HDL naissantes, particules discoïdales riches en phospholipides et en cholestérol libre, contenant majoritairement les apo A-I et A-II (Eisenberg et al., 1984). 2) Les HDL peuvent également être formées après lipolyse des chylomicrons et des VLDL, qui fournissent les apolipoprotéines, les phospholipides et le cholestérol qui seront transférés sur les HDL naissantes (Tall et Small, 1978). 3) Enfin, les HDL naissantes pourraient résulter de l'association directe entre apolipoprotéines et phospholipides dans le compartiment extracellulaire (Hara et Yokohama, 1991).

Le transport inverse du cholestérol peut être séparé en quatre étapes.

La première étape du transport inverse du cholestérol est l'efflux de cholestérol cellulaire. Les premiers accepteurs de cholestérol sont des particules HDL contenant de l'apo A-I, que l'on nomme Préβ-LpAI (Fielding et Fielding, 1995). Concernant cette étape, deux mécanismes d'efflux ont été proposés : un efflux dépendant d'un récepteur et un efflux par diffusion.

Dans le premier mécanisme, les HDL se fixeraient sur un récepteur spécifique. Le cholestérol intracellulaire serait alors orienté vers la membrane, puis capté par les HDL. Ce concept vient de l'observation faite par plusieurs auteurs de la présence de sites de fixation à haute affinité pour les HDL sur la membrane de plusieurs types cellulaires (pour revue, Catapano, 1987; Fielding et Fielding, 1995). Comme nous l'avons vu précédemment, les HBP pourraient également intervenir dans ce mécanisme (Oram et al., 1983; Fidge et Nestel, 1985). La deuxième théorie concerne un efflux de cholestérol par diffusion, qui a été proposé par Rothblat et al. (1992). L'apo A-I des HDL pourrait s'ancrer dans la membrane cellulaire, aux endroits pauvres en cholestérol. En effet, la membrane cellulaire n'est pas homogène dans sa répartition en cholestérol (Schroeder et al., 1991). Après ancrage, il y aurait recrutement des pools de cholestérol libre, qui seraient alors intégrés dans la HDL (Rothblat et al., 1992). Il n'existe pas de données précises favorisant l'un ou l'autre des mécanismes, mais l'efflux de cholestérol pourrait résulter de ces deux mécanismes.

La deuxième étape est l'activation de la LCAT qui permet l'estérification du cholestérol libre au niveau des HDL3, pour les convertir en HDL2. Comme nous l'avons vu, l'apo A-I est un cofacteur de la LCAT (Fielding et al., 1972). Plus récemment,

Francone et al. (1995), ont confirmé ce rôle dans des souris transgéniques pour la LCAT (Francone et al., 1995; Mehlum et al., 1995). Ces animaux présentent plus d'esters de cholestérol dans les HDL, montrant une activité accrue de la LCAT. Si ces animaux sont rendus également transgéniques pour l'apo A-I, cette activité est encore plus importante. Enfin, si à ces animaux, on rajoute en plus l'apo A-II, l'activité LCAT est nettement réduite (Francone et al., 1995). Ces auteurs proposent que l'apo A-II, en déplaçant l'apo A-I de la surface des HDL, la rendrait moins accessible à la LCAT, ce qui pourrait expliquer l'effet inhibiteur de l'apo A-II sur la LCAT par un mécanisme indirect. Ces résultats obtenus *in vivo*, montrent la préférence de LCAT pour les particules contenant l'apo A-I (Francone et al., 1995). Néanmoins, il n'existe pas encore de données concernant les sites de l'apo A-I impliqués dans cet effet.

La troisième étape consiste au transfert du cholestérol estérifié des HDL vers les lipoprotéines riches en apo B (VLDL, IDL et LDL), par le biais de la CETP (Deckelbaum et al., 1986). La CETP permet aux particules lipoprotéiques riches en apo B d'échanger leurs triglycérides avec les HDL. En retour, les HDL donnent leurs esters de cholestérol. Les HDL enrichies en triglycérides deviennent plus susceptibles à la lipolyse par l'HTGL (Deckelbaum et al., 1986).

Enfin, la dernière étape consiste en un apport direct du cholestérol vers le foie. La voie majeure de cette étape résulte du transfert des esters de cholestérol vers les VLDL et les LDL qui se fixe alors sur le LDL-R au niveau hépatique (Fielding et Fielding, 1995). Le cholestérol estérifié est alors transféré dans la cellule pour y être catabolisé. Cependant, la découverte récente d'un récepteur aux HDL, le SR-BI, confirme la théorie proposant un récepteur spécifique aux HDL sur la surface membranaire de l'hépatocyte (Acton et al., 1996). En effet, le SR-BI se fixe avec une haute affinité sur l'hépatocyte et possède une grande capacité à libérer ses esters de cholestérol à l'intérieur de celui-ci (Acton et al., 1996). Enfin, sous l'action de l'HTGL, les HDL2 se convertissent en HDL3 qui peuvent recommencer un cycle, et le foie peut capter directement les lipides libérés.

Si ces données représentent les données du métabolisme des HDL basées sur la classification classique des lipoprotéines, on ne peut plus actuellement dissocier de ce métabolisme, le rôle particulier des LpAI et LpAI:AII. L'isolation de ces deux particules a permis de mieux comprendre le métabolisme des HDL et le rôle des apo A-I et A-II dans ce métabolisme. Les LpAI et LpAI:AII sont représentées dans les HDL2 et dans les HDL3 (Ohta et al., 1988).

Il a été montré que les LpAI, au contraire des LpAI:AII, sont capables d'effectuer l'efflux de cholestérol de manière très efficace (Barbaras et al., 1987). Ceci apporte un mécanisme potentiel concernant le rôle proathérogène de l'apo A-II et confirme le rôle protecteur attribué à l'apo A-I (Puchois et al., 1987).

De plus, ces particules ont des affinités différentes pour les différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des HDL. Ainsi, les LpAI:AII, secrétées par le foie, semblent être les premières acceptrices de la LCAT. Ces particules peuvent libérer de l'apo A-I, qui peut alors reformée une pré $\beta$ LpAI. Du fait de l'affinité de la LCAT pour l'apo A-I, cette enzyme reste préférentiellement associée à la pré $\beta$ LpAI (Fielding et Fielding, 1995). Les études sur les souris transgéniques précédemment citées confirment la préférence de la LCAT pour les particules ne contenant que de l'apo A-I, par rapport aux particules contenant les apo A-I et A-II (Francone et al., 1995).

La CETP se retrouve principalement associée au LpAI:AII dans le plasma, bien qu'elle puisse également être associée au LpAI (Fielding et Fielding, 1995). Par contre, l'apo A-II n'inhibe pas l'activité de la CETP *in vivo* dans des souris transgéniques pour la CETP et les apo A-I et A-II (Zhong et al., 1995). Mais, l'apo A-II inhibe l'activité de la lipase hépatique (Zhong et al., 1995). De ce fait, les LpAI seraient plus susceptibles à l'activité de cette enzyme que les LpAI:AII.

Malgré ces résultats, beaucoup reste à faire, pour comprendre le métabolisme précis de ces particules. Néanmoins, le fait majeur à retenir de ces observations est la faible capacité des LpAI:AII à promouvoir le transport inverse du cholestérol. Selon Fielding et Fielding (1995), les LpAI seraient principalement impliquées dans l'efflux de cholestérol, étape limitante de ce transport. Les LpAI:AII, interviendrait probablement plus au niveau des échanges triglycérides/esters de cholestérol avec les lipoprotéines riches en apo B (Fielding et Fielding, 1995).

Les taux de LpAI sont en fait inversement corrélés à la quantité d'apo A-II produite. La production d'apo A-II est donc le facteur déterminant dans la distribution de l'apo A-I dans les LpAI et LpAI:AII (Ikewaki et al., 1995). Etant donné le rôle de la LpAI dans l'efflux, le taux de production de l'apo A-II, pourrait être un facteur limitant de la capacité des HDL à effectuer le transport inverse du cholestérol, et donc un facteur limitant dans la protection contre l'athérosclérose. Les niveaux d'expression des deux gènes codant pour les apo A-I et A-II sont donc essentiels au métabolisme des HDL, c'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à la régulation de l'expression de ces deux gènes.

## A.2. Régulation du métabolisme lipoprotéique

### A.2.1. Régulation par les facteurs nutritionnels

#### A.2.1.1. Régulation par le cholestérol

Chez l'homme, une alimentation riche en cholestérol provoque une hypercholestérolémie qui se traduit par une augmentation du taux plasmatique de LDL, facteur favorisant le développement de l'athérosclérose. L'étude du mécanisme régissant cet effet a été étudié chez le rat, puisque cet animal répond de manière identique, à un excès de cholestérol dans l'alimentation, à condition que ce dernier soit accompagné d'acides gras, principalement saturés, ou encore de produits favorisant l'absorption des triglycérides au niveau intestinal. Dans ces conditions, le cholestérol produit le même effet hypercholestérolémiant, en provoquant une augmentation des VLDL et LDL plasmatiques (Mathe et al., 1991). L'apo B étant la principale apolipoprotéine de ces lipoprotéines, un certain nombre d'études ont été réalisées, afin d'étudier si l'effet du cholestérol faisait intervenir une régulation de l'expression du gène de l'apo B.

Chez le rat, le cholestérol alimentaire provoque une induction des taux hépatiques d'ARNm de l'apo B (Matsumoto et al., 1987). Par contre chez les primates, cet effet n'est pas retrouvé, ni sur la synthèse, ni sur la sécrétion de l'apo B (Sorci-Thomas et al., 1989). La différence d'effets observés pourrait résulter d'une différence de régulation entre espèces, ou plus probablement d'une différence entre les régimes utilisés dans ces expériences. Quoi qu'il en soit, l'effet du cholestérol ne semble pas faire intervenir une augmentation de l'expression du gène de l'apo B. Lorsque une augmentation de la production des VLDL et des LDL est observée, elle pourrait donc résulter d'une clairance diminuée de ces lipoprotéines. Une étude récente a montré que le cholestérol alimentaire provoquait une réduction des taux d'ARNm de la lipase hépatique (HTGL) (Sultan et al., 1995). L'HTGL favorise l'hydrolyse des chylomicrons remnants (IDL) et des VLDL en LDL, qui peuvent alors être captés au niveau du foie par le récepteur aux LDL (LDL-R). En réduisant l'activité de cette enzyme, le cholestérol défavoriserait la clairance de ces lipoprotéines, ce qui expliquerait l'augmentation des taux plasmatiques de cholestérol.

Chez l'homme, l'augmentation du cholestérol plasmatique observée après un régime riche en cholestérol alimentaire, résulte également d'une diminution de la clairance des lipoprotéines riches en apo B. En effet, chez l'homme, plus particulièrement dans la cellule HepG2, le cholestérol inhibe les taux hépatiques d'ARNm du LDL-R en agissant sur la transcription de ce gène (Dashti et al., 1992), ce qui confirme les résultats obtenus chez les primates (Sorci-Thomas et al., 1989). Südhof et al. (1987) ont montré que le promoteur du gène du LDL-R contient un élément de réponse au cholestérol, nommé Sterol Regulatory Element (SRE). Le SRE est un élément positif conditionnel : il

augmente la transcription du gène en absence de stérol et l'inhibe en présence de stérol (Smith et al., 1990). Le SRE a également été identifié dans deux autres gènes, impliqués dans la voie de néosynthèse du cholestérol. Il s'agit des gènes codant pour la 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA (HMG-CoA) synthase (Osborne et al., 1985) et la 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA (HMG-CoA) reductase (Smith et al., 1988). Ces mécanismes inhibiteurs permettraient à l'organisme de réguler ses concentrations plasmatiques en cholestérol, d'abord en diminuant la captation de cholestérol par les cellules, ensuite, en inhibant sa néosynthèse. Plus récemment, deux facteurs de transcription fixant ce site, le SREBP-1 et le SREBP-2 ont été identifiés (Briggs et al., 1993). Concernant le SREBP-1, en absence de stérol, il est clivé dans sa partie N-terminale, pénètre dans le noyau et active la transcription du gène. En présence de stérol, ce clivage n'a plus lieu, le SREBP-1 ne peut plus rentrer dans le noyau, et le gène n'est plus activé (Sato et al., 1994).

Concernant le métabolisme des HDL, à notre connaissance, peu de données claires ont été fournies sur un éventuel effet du cholestérol sur l'expression hépatique des gènes impliqués dans la structure de ces lipoprotéines.

En conclusion, l'hypercholestérolémie se traduit principalement par une augmentation des concentrations plasmatiques de LDL, du fait d'une clairance diminuée de ces particules.

#### A.2.1.2. Régulation par les carbohydrates

Chez l'homme, le changement d'un régime riche en acides gras saturés, vers un régime riche en carbohydrates et pauvre en lipides provoque une augmentation des concentrations en triglycérides (Ginsberg et al., 1976). Cette augmentation est le résultat d'un augmentation de la synthèse hépatique des lipoprotéines riches en triglycérides, les VLDL (Melish et al., 1980). De plus, cet effet s'accompagne d'une baisse des concentrations plasmatiques du LDL-cholestérol (Mensink et al., 1989). Les glucides alimentaires simples (glucose, fructose, saccharose) ont un effet sur la concentration de ces lipoprotéines plus prononcé que les glucides complexes, comme l'amidon (Grundy et Denke, 1990).

L'effet des carbohydrates sur les VLDL pourrait donc s'expliquer par une modulation de l'expression du gène de l'apo B au niveau transcriptionnel. Des études réalisées chez le rat, ont montré qu'un régime riche en glucides simples induit de même manière la synthèse des VLDL et une hypertriglycéridémie (Ruderman et al., 1971). Des cultures primaires d'hépatocytes de rats, nourris pendant trois jours avec du saccharose, montrent une augmentation de la synthèse de l'apo B (Boogaerts et al., 1984). La même expérience, réalisée avec des rats nourris pendant trois semaines au saccharose, ne

montre pas d'effets sur la synthèse de cette apolipoprotéine, mais montre par contre, une augmentation de synthèse et de taux d'ARNm de l'apo E (Strobl et al., 1989). Ces même auteurs suggèrent que cet effet serait dû à une augmentation de la transcription du gène de l'apo E. La différence d'effets observés montre que l'effet des carbohydrates sur l'expression du gène de l'apo B n'est pas très clair. Si l'effet n'est pas transcriptionnel, il pourrait être traductionnel. En effet, l'apo B posséde la particularité de traduire deux protéines : l'apo B-48 et B-100. L'apo B-48 résulte d'un mécanisme d'édition défaillant de l'ARNm codant pour l'apo B. Chez l'homme, l'apo B-48 est synthétisée dans l'intestin, où elle est associée aux chylomicrons. L'apo B-100 est synthétisée dans le foie, et s'associe aux VLDL. Chez le rat, la situation intestinale est similaire, par contre, dans le foie de rat, les apo B-48 et B-100 sont synthétisées en quantité égale (pour revue, Scott et al., 1994). Chez des animaux mis à jeûne pendant 48 heures, la synthèse et les taux d'ARNm hépatiques de l'apo B sont induits. L'apport consécutif à ces animaux d'un régime riche en saccharose provoque une diminution de la synthèse d'apo B-100 au niveau hépatique (Baum et al., 1990). Cette diminution est due à une induction du mécanisme d'édition de l'apo B, favorisant la maturation des ARNm codant pour l'apo B-48 (Baum et al., 1990). Ces résultats montrent que l'augmentation des concentrations des VLDL n'est pas accompagnée d'une augmentation de synthèse en apo B-100, un de ces composant protéique majeur. Il est donc suggéré que c'est la quantité de triglycérides par lipoprotéines qui serait augmentée et donc le ratio triglycérides/apo B (Grundy et Denke, 1990).

Le changement d'un régime riche en acides gras saturés vers un régime riche en carbohydrates provoque une diminution des concentrations plasmatiques de HDL cholestérol (Mensink et Katan, 1987). Cet effet s'accompagne d'une baisse des concentrations en apo A-I et A-II, constituants protéiques majeurs de ces lipoprotéines (Mensink et al., 1989). On peut donc supposer que ces produits agissent en inhibant l'expression hépatique du gène de ces apolipoprotéines. Des cultures primaires d'hépatocytes de rats, nourris pendant trois jours avec du saccharose, montrent une augmentation de la synthèse de l'apo A-I (Boogaerts et al., 1984). La même expérience, réalisée avec des rats nourris pendant trois semaines au saccharose, ne montre pas d'effets sur la synthèse de cette apolipoprotéine (Strobl et al., 1989). D'autres auteurs ont décrit des résultats différents, en particulier, Radosavljevic et al. (1992), montrent que le saccharose n'a pas d'effets sur les taux hépatiques d'ARNm de l'apo A-I, mais augmente ceux de l'apo A-IV (Radosavljevic et al., 1992). Enfin, Baum et al. (1990) ont décrit une augmentation des taux d'ARNm de l'apo A-I, sans changement de sa synthèse, sur des foies de rats nourris pendant 48 heures avec du saccharose (Baum et al., 1990). L'ensemble de ces résultats montre que les carbohydrates réduisent les concentrations plasmatiques de HDL par un mécanisme qui demeure non élucidé. Cet effet ne fait

probablement pas intervenir une régulation de l'expression du gène de l'apo A-I, comme le suggèrent les résultats contradictoires obtenus par les différents auteurs. Certains auteurs ont avancé l'hypothèse qu'après traitement aux carbohydrates, l'apo A-I serait recrutée pour la synthèse des lipoprotéines riches en triglycérides au niveau intestinal (Grundy et Denke, 1990). Si néanmoins une régulation sur le gène de l'apo A-I existe, elle doit faire intervenir des mécanismes très complexes certainement dépendant du statut alimentaire de l'animal. Cette régulation pourrait faire intervenir un élément de réponse au glucose (GIRE) du type de celui identifié primairement dans le promoteur du gène L-type Pyruvate Kinase (L-PK)(Diaz-Guerra et al., 1991), et depuis dans le gène S14 (Spot 14)(Shih et Towle, 1992). Cependant l'existence de tels mécanisme de régulation par les carbohydrates sur les gènes des apolipoprotéines demeurent inconnus.

#### A.2.1.3. Régulation par les acides gras

Chez l'homme et chez les rongeurs, les acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés ont des effets complexes et variés sur le métabolisme des lipoprotéines. De surcroît, des acides gras appartenant à une même classe peuvent induire des effets différents. Nous rappelerons dans ce chapitre les principales données concernant ces effets.

##### *Régulation par les acides gras saturés*

Chez l'homme, les acides gras saturés ne provoquent pas d'hypertriglycéridémie et n'a pas d'effets sur les concentrations plasmatiques de VLDL (Grundy et Denke, 1990). Par contre, ce traitement s'accompagne d'une hypercholestérolémie due principalement à une diminution de l'activité du LDL-R au niveau hépatique (Grundy et Denke, 1990). L'effet des acides gras ne semble donc pas être médié par un effet sur l'expression des gènes codant pour les apolipoprotéines constitutives de ces lipoprotéines. L'utilisation des modèles animaux, en particulier le rat, a permis de confirmer cette hypothèse. Un régime riche en acides gras saturés, en remplacement d'un régime riche en carbohydrates, ne provoque pas d'effets sur la synthèse et le taux d'ARNm de l'apo B au niveau hépatique chez le rat (Ribeiro et al., 1992) et la souris (Srivastava et al., 1991). Par contre, ce régime entraîne une baisse en apo E, corrélée avec une baisse des taux hépatiques d'ARNm de cette apolipoprotéine (Ribeiro et al., 1992). Ces résultats semblent confirmer que chez le rat, l'hypercholestérolémie ne résulte pas d'une synthèse accrue de VLDL. Par contre, chez les primates, un régime riche en acides gras saturés et cholestérol provoque une augmentation des concentrations plasmatiques des LDL, accompagnée d'une augmentation de la concentration plasmatique en apo B, lorsqu'il est comparé avec un régime isocalorique pauvre en cholestérol. Cet effet ne s'accompagne

néanmoins pas d'une augmentation des taux d'ARNm de l'apo B (Sorci-Thomas et al., 1989). Cela implique, que l'effet des acides gras saturés sur l'apo B n'est pas transcriptionnel, mais post-transcriptionnel. Cette augmentation de concentration plasmatique en apo B s'expliquerait par un transport du cholestérol par les chylomicrons plus important, du fait de la grande quantité de cholestérol apportée par le régime.

Chez l'homme, le changement d'un régime riche en carbohydrates vers un régime riche en acides gras saturés provoque une augmentation des concentrations plasmatiques en HDL (Grundy et al., 1988, pour revue, Katan et al., 1994). On peut se demander si cet effet ne serait pas à attribuer à une augmentation de l'expression du gène de l'apo A-I et/ou de l'apo A-II. Chez le rat, la substitution des acides gras pour les carbohydrates, provoque une augmentation des concentrations plasmatiques de l'apo A-I (Ribeiro et al., 1992). Chez la souris, cette augmentation s'accompagne d'une induction des taux d'ARNm de l'apo A-I (Srivastava et al., 1992a). Ces résultats indiquent que les acides gras saturés pourraient agir sur l'expression du gène de l'apo A-I, ce qui se traduirait par une augmentation de synthèse de cette protéine et donc une augmentation des concentrations plasmatiques de HDL.

Chez les primates, le même type de régime provoque une augmentation de la sécrétion et des taux hépatique d'ARNm de l'apo A-I. Cet effet est bien lié aux acides gras saturés, puisque ces résultats sont indépendants de la concentration en cholestérol des régimes testés (c'est-à-dire acides gras saturés +/- cholestérol) (Stucchi et al., 1991).

#### *Régulation par les acides gras monoinsaturés*

Chez l'homme, le remplacement d'acides gras saturés, par les acides gras monoinsaturés dans l'alimentation, provoque une légère augmentation des concentrations plasmatiques en triglycérides. Par contre, si ces concentrations sont comparées à celles obtenus avec un régime riche en carbohydrates, les acides gras monoinsaturés diminuent les concentrations plasmatiques en triglycérides (Katan et al., 1994). Le même traitement provoque une diminution des taux plasmatiques de LDL et de cholestérol, ce qui pourrait abaisser le risque cardiovasculaire (Mattson et Grundy, 1985). Chez le rat, l'utilisation de l'acide oléique, principal représentant des acides gras monoinsaturés, a permis d'évaluer, l'effet des acides gras monoinsaturés sur le métabolisme lipoprotéique. L'acide oléique stimule la synthèse et la sécrétion de triglycérides par un foie de rat perfusé (Salam et al., 1988). Cependant, malgré l'augmentation de synthèse des triglycérides, on n'observe pas d'augmentation de synthèse d'apo B au niveau hépatique (Salam et al., 1988). L'augmentation des concentrations plasmatiques de triglycérides ne résulterait donc pas d'une synthèse accrue de VLDL.

Chez le singe, lorsqu'un régime riche en acides gras saturés est substitué à un régime isocalorique riche en acides gras monoinsaturés, il provoque une diminution des concentrations plasmatiques du cholestérol des LDL. Cette baisse ne s'accompagne pas d'une diminution des taux hépatiques d'ARNm des apo B et E, alors que les taux d'apo C-III sont fortement réprimés (Brousseau et al., 1995). Des cellules HepG2, cellules d'hépatome humain couramment utilisées pour leur capacité à exprimer les apolipoprotéines, traitées avec de l'acide oléique, présentent une induction de la synthèse de triglycérides (Dashti et Wolfbauer, 1987; Pullinger et al., 1989). Par contre, des résultats contradictoires sont obtenus sur les cellules HepG2 par ces deux équipes. Pullinger et al.(1989), montrent une augmentation de la synthèse, mais pas des taux d'ARNm de l'apo B après un traitement à l'acide oléique, alors que Dashti et Wolfbauer (1989) n'observent pas cet effet. Cette différence pourrait s'expliquer par la durée du traitement, car l'augmentation de la synthèse d'apo B intervient très rapidement et transitoirement (Pullinger et al., 1989). Les résultats obtenus récemment par Kurokawa et al. (1995) montrent que dans la cellule HepG2, l'acide oléique induit la sécrétion d'apo B en inhibant sa dégradation (Kurokawa et al., 1995). Ces résultats montrent que le gène de l'apo B peut être régulé de manière post-transcriptionnelle par les acides gras monoinsaturés.

Chez l'homme, par rapport à un régime riche en carbohydrates, les acides gras augmentent les concentrations plasmatiques en HDL (Katan et al., 1994). Par contre, par rapport à un régime riche en acides gras saturés, les acides gras monoinsaturés provoquent une légère diminution des concentrations plasmatiques de HDL (Grundy, 1994; Katan et al., 1994). Ces effets pourraient résulter de niveaux de régulation différents sur l'expression du gène de l'apo A-I. Chez le rat, un régime riche en huile d'olive, qui contient principalement des acides gras monoinsaturés, en remplacement d'un régime isocalorique, équilibré en lipides et carbohydrates, stimule l'expression du gène de l'apo A-I (Osada et al., 1991). Cependant, cette étude ne précise pas si cette augmentation est corrélée avec une augmentation des concentrations plasmatiques en HDL.

De la même manière, chez l'homme, avec le même type de régime, l'augmentation des concentrations plasmatiques en HDL, s'accompagne d'une augmentation des concentrations plasmatiques en apo A-I (Luc et al., 1991). Chez le singe, lorsqu'un régime riche en acides gras saturés est substitué à un régime isocalorique riche en acides gras monoinsaturés, il provoque une diminution des concentrations plasmatiques du cholestérol des HDL. Cette baisse s'accompagne d'un diminution des taux plasmatique de l'apo A-I des HDL, sans augmentation des taux hépatiques d'ARNm de l'apo A-I (Brousseau et al., 1995). Des cellules Hep G2 traitées à l'acide oléique ne montrent pas de variations dans la sécrétion et les taux d'ARNm des apo A-I et E (Dashti et al., 1989).

Dans ces cellules, les acides gras ne semblent pas intervenir sur la synthèse de l'apo A-I, mais aucun élément ne permet actuellement de fournir une réponse à cette différence d'effets.

#### *Régulation par les acides gras polyinsaturés*

Chez l'homme, lorsqu'un régime riche en carbohydrates ou en acides gras saturés, est remplacé par un régime isocalorique riche en acides gras polyinsaturés, il provoque une diminution des concentrations plasmatiques en triglycérides et LDL (Katan et al., 1994). Les acides gras polyinsaturés (PUFA) naturels appartiennent à deux grandes catégories : les acides gras de la famille (n-3) et ceux de la famille (n-6).

L'acide linoléique (n-6), retrouvé dans les huiles végétales, diminue la synthèse des VLDL, la production des LDL et la concentration plasmatique en cholestérol et triglycérides (Grundy et Denke, 1990). Les PUFA (n-3), principalement retrouvés dans les huiles de poissons, réduisent les triglycérides plasmatiques en baissant leur synthèse hépatique (Philipson et al., 1995). Chez le rat, un régime riche en huiles de poissons, diminue la synthèse du cholestérol et la synthèse et la sécrétion des triglycérides. Chez ces animaux, la concentration plasmatique en apo B-100, mais pas en apo B-48, diminue, sans que les taux d'ARNm ne soient modifiés (Ribeiro et al., 1991). Cependant, la synthèse hépatique d'apo B est diminuée sous l'effet des huiles de poissons (Wang et al., 1993). Des cellules Hep G2, traitées à l'acide docosahexaenoïque (DHA) ou à l'acide eicosapentaenoïque (EPA), tout deux PUFA (n-3), montrent une réduction de la synthèse des triglycérides et des VLDL. Cet effet n'est pas corrélé avec une diminution des taux d'ARNm de l'apo B (Wong et al., 1989). Ces résultats suggèrent que les PUFA (n-3) affectent la synthèse d'apo B à un niveau post-transcriptionnel (Ribeiro et al., 1991). Les huiles de poissons baissent la synthèse, la sécrétion et les taux d'ARNm de l'apo E sans provoquer de variations dans la concentration plasmatique de cette apolipoprotéine (Ribeiro et al., 1991). Ces baisses de concentrations, observées après traitement aux acides gras polyinsaturés, pourraient résulter d'une augmentation de la clairance des LDL, mais cela reste à démontrer.

Lorsque les acides gras polyinsaturés remplacent les carbohydrates, cela provoque une augmentation des concentrations plasmatiques des HDL. Par contre, lorsqu'ils remplacent les acides gras saturés, ils provoquent une diminution des concentrations plasmatiques de HDL (Mattson et Grundy, 1985; Weintraub et al., 1988). Un régime riche en PUFA (n-6) provoque une diminution des concentrations plasmatiques de HDL (Mattson et Grundy, 1985). Tout comme les PUFA (n-6), les PUFA (n-3) provoquent également une baisse des concentrations plasmatiques de HDL (Weintraub et al., 1988).

Chez le singe, un régime riche en acides gras polyinsaturés provoque le même effet qu'un régime riche en acides gras monoinsaturés (baisse des HDL et apo A-I

plasmatique). Dans ce cas, la baisse en apo A-I plasmatique est attribuée à une augmentation du catabolisme de l'apo A-I des HDL (Brousseau et al., 1995). Ces résultats montrent que les acides gras peuvent moduler l'expression du gène de certaines apolipoprotéines. Ces mécanismes demeurent inconnus, néanmoins, au cours des dernières années, il a été montré que les acides gras polyinsaturés peuvent réguler directement l'expression de certains gènes. C'est le cas du gène Spot 14 (S14), qui porte un élément de réponse aux PUFAs, le PUFA-RE (PUFA-response element)(Jump et al., 1993). De plus, les acides gras, en particulier les polyinsaturés, activent un facteur de transcription récemment cloné, le Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR)(Isseman et Green, 1990), membre de la famille des récepteurs nucléaires, dont l'implication dans la régulation de certains gènes clés du métabolisme lipidique est de toute importance.

Ce chapitre nous a permis de mettre en évidence les principaux effets des carbohydrates et des acides gras sur le métabolisme lipoprotéique, en particulier sur le métabolisme des LDL et des HDL. Ces effets sont schématiquement représentés dans la figure 2.

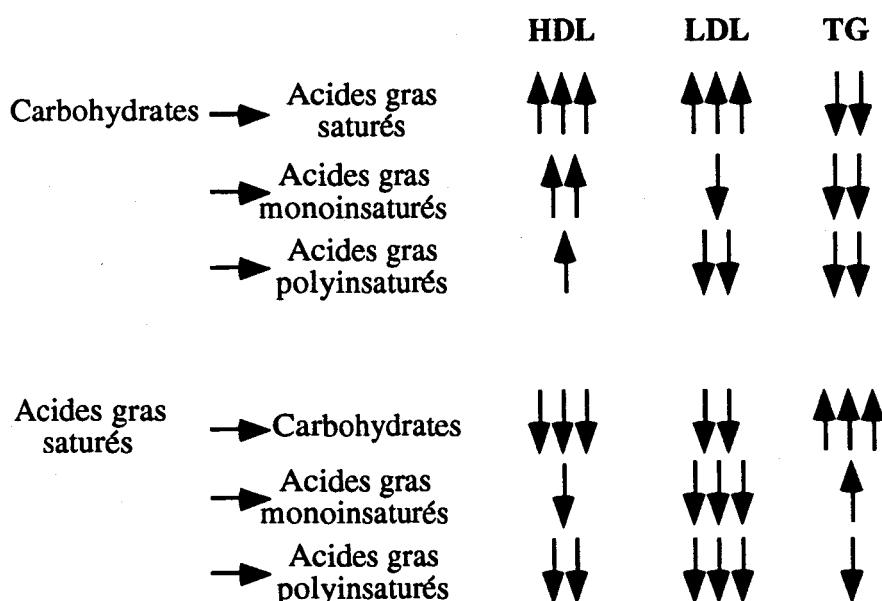


Figure 2 : Effet des changements de régime sur la concentration plasmatique des LDL et HDL. Le nombre de flèches montantes (induction des taux) ou descendantes (réduction des taux) donne une idée relative de l'importance de l'effet. D'après Katan et al. (1989).

### A.2.2. Régulation par les facteurs hormonaux

Toutes les cellules s'adaptent à des changements dans l'environnement extérieur par une modification de l'expression de leurs gènes. Dans les organismes multicellulaires, cette réponse à des stimuli extérieurs peut être médiée par voie hormonale, nerveuse ou encore par des facteurs nutritionnels. Les cellules concernées par cette réponse peuvent recevoir le signal de deux manières différentes : soit via un récepteur situé sur la membrane cellulaire, la transduction du message se faisant par voie de second messager pouvant amener à l'activation d'un facteur de transcription, lequel produira l'effet sur le gène cible; soit en pénétrant dans la cellule (c'est le cas des substances hydrophobes) et en se fixant sur des récepteurs nucléaires qui constituent des facteurs de transcription capables de produire directement l'effet sur le gène cible.

Dans cette famille de récepteurs nucléaires, on peut distinguer deux groupes possédant la même structure, mais différant par leur mode d'activation.

Les récepteurs de type I sont cytoplasmiques et sont transférés vers le noyau après fixation du ligand (Figure 3). Dans ce groupe, on retrouve : le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), aux androgènes (AR), aux progestérones (PR), aux minéralocorticoïdes (MR) et aux oestrogènes (ER).

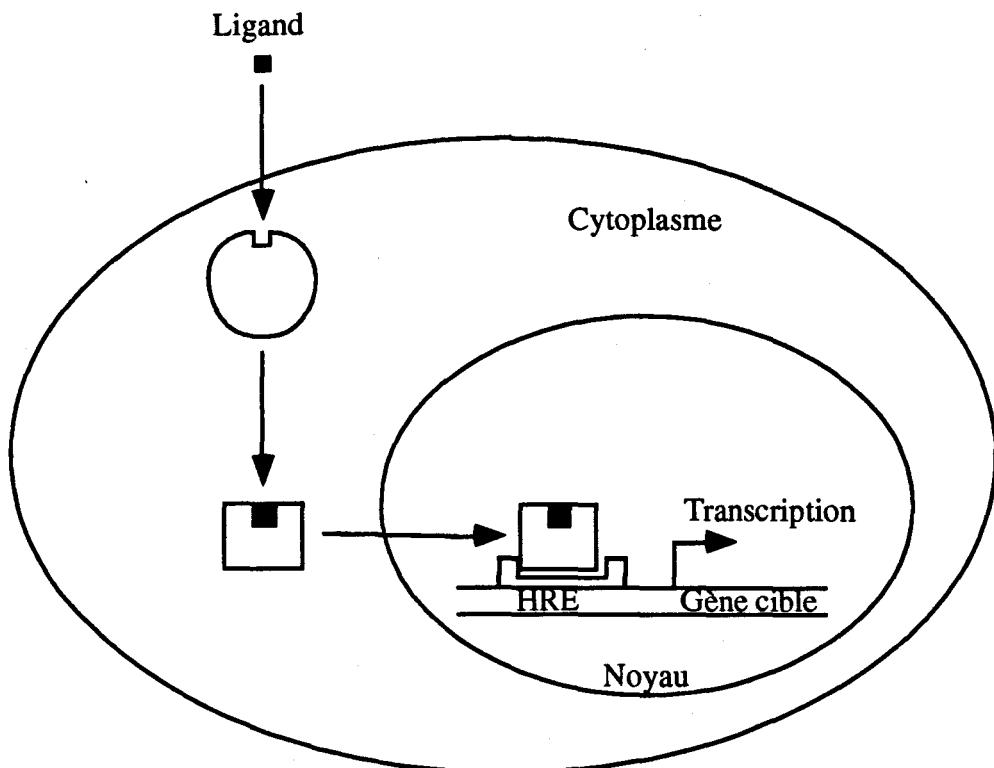
Les récepteurs de type II, plus petits, sont nucléaires et ne nécessitent pas forcément la présence du ligand pour se fixer à l'ADN (Figure 3). Dans ce groupe, on retrouve : le récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR), à l'acide rétinoïque (RAR), à l'acide 9-cis rétinoïque (RXR), à la vitamine D (VDR) et la plupart des récepteurs nucléaires orphelins, dont le membre le plus étudié est le "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor" (PPAR).

Ces deux types de récepteurs produisent leurs effets en se fixant sur une séquence consensus, qui est spécifique à chacun d'entre eux et que l'on nomme "Hormone Response Element" (HRE). Après fixation du récepteur sur le HRE, le gène cible sera activé ou réprimé via une interaction du récepteur fixé sur son site et la machinerie transcriptionnelle de base du gène.

De tels récepteurs, peuvent médier la réponse à des facteurs hormonaux, nutritionnels ou pharmacologiques ayant un effet sur le métabolisme lipidique en agissant sur l'expression des gènes cibles, comme ceux des apolipoprotéines, impliqués dans ce métabolisme. Dans le cas où le mécanisme moléculaire de la régulation est déterminé, il devient possible d'envisager la mise au point de molécules agissant en agoniste ou antagoniste de ces récepteurs dans le cadre d'une thérapie éventuelle.

Ce chapitre se propose de passer en revue les effets des principales hormones sur le métabolisme lipoprotéique et de donner l'état des travaux concernant les mécanismes impliqués.

Récepteur type I :



Récepteur type II :

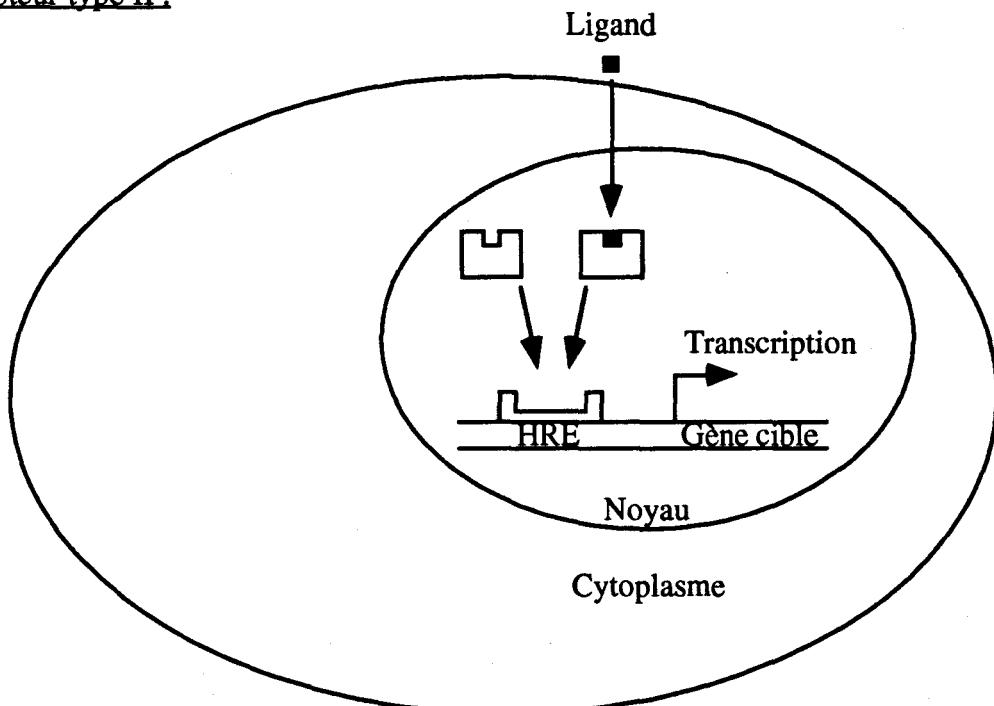


Figure 3 : Mode d'action des deux types de récepteurs nucléaires.

### A.2.2.1. Hormones agissant par des récepteurs nucléaires

#### *Régulation par les hormones thyroïdiennes*

Chez l'homme, des altérations du fonctionnement thyroïdien sont couramment associées à des perturbations des taux de lipides plasmatiques. L'hypothyroïdie est associée à une hypercholestérolémie, liée à une accumulation plasmatique de LDL, parfois de VLDL (Miura et al., 1994). Un traitement substitutif à base d'hormones thyroïdiennes permet en général de normaliser ces paramètres (Miura et al., 1994). Par contre, l'hyperthyroïdie est associée avec une baisse des concentrations plasmatiques en LDL (Kung et al., 1995). Ces résultats suggèrent que les hormones thyroïdiennes sont capables de moduler la concentration de ces lipoprotéines. La question est de savoir, si ces hormones agissent au niveau de la synthèse et/ou du catabolisme des VLDL et LDL.

Chez le rat, l'hypothyroïdie provoque des effets similaires à ceux observés chez l'homme. La reproductibilité du résultat chez cet animal en fait un bon modèle d'étude pour les effets des hormones thyroïdiennes. Ainsi, chez le rat, l'hypothyroïdie est associée à une élévation de la concentration plasmatique de LDL. Cette augmentation est corrélée avec une augmentation de la concentration plasmatique d'apo B (Staels et al., 1990a). Par contre, l'administration d'hormones thyroïdiennes à ces animaux, baisse la concentration plasmatique en apo B (Staels et al., 1990a). Les hormones thyroïdiennes pourraient donc moduler l'expression de l'apo B. Cependant, dans la même expérience, les taux d'ARNm de l'apo B ne sont pas modifiés (Davidson et al., 1988; Staels et al., 1990a). Ainsi, les hormones thyroïdiennes n'agiraient pas au niveau transcriptionnel, mais plus en aval, peut-être au niveau des mécanismes d'édition de l'apo B. Dans ce sens, Davidson et al. (1988), ont observé une réduction modeste de la synthèse hépatique des deux formes d'apo B, et une nette diminution de la synthèse d'apo B-48 au niveau intestinal (Davidson et al., 1988). Les mêmes auteurs ont montré que chez des animaux hyperthyroïdiens, aucune synthèse d'apo B-100 n'est détectable au niveau hépatique. Par contre, une augmentation des taux d'ARNm de l'apo B-48, sans augmentation de sa synthèse, est observée (Davidson et al., 1988). Ainsi, les hormones thyroïdiennes modulent les concentrations des VLDL et LDL, en modulant les mécanismes d'édition de l'apo B chez le rat. En plus de cet effet sur la synthèse, les hormones thyroïdiennes semblent jouer un rôle prédominant dans le catabolisme de ces lipoprotéines. En effet, chez le rat, au niveau intestinal et hépatique, l'hypothyroïdie provoque une baisse des taux d'ARNm du récepteur aux LDL (Staels et al., 1990a). Cet effet est dû à l'hormone thyroïdienne puisqu'un traitement aux hormones thyroïdiennes chez ces animaux provoque une augmentation des taux d'ARNm de ce récepteur (Staels et al., 1990a). Chez le rat, la concentration plasmatique et la synthèse hépatique d'apo E augmentent lors d'hypothyroïdie et diminuent en cas d'hyperthyroïdie, alors que les taux d'ARNm ne

varient pas dans ces conditions (Staels et al., 1990a; Davidson et al., 1988; Staels et al., 1990b). L'apo E pouvant être reconnu par le récepteur aux LDL, les variations observées dans les concentrations plasmatiques de cette apolipoprotéine, pourraient résulter d'une clairance des lipoprotéines contenant de l'apo E dépendante du niveau d'expression du récepteur aux LDL.

Chez l'homme, l'hypercholestérolémie, principalement en LDL, consécutive à l'hypothyroïdie s'accompagne d'une baisse de l'activité du récepteur aux LDL et d'une augmentation de la concentration plasmatique en apo B (Wiseman et al., 1993). Sur les cellules HepG2, les hormones thyroïdiennes induisent les taux d'ARNm et la synthèse de l'apo B et E (Thériault et al., 1992a; Vandenbrouck et al., 1994). Pour le gène de l'apo E, les hormones thyroïdiennes agissent en augmentant son taux d'ARNm et accélérant la traduction de la protéine. Ces hormones agissent donc au niveau post-transcriptionnel sur ce gène (Vandenbrouck et al., 1994). Dans ces cellules, la régulation par ces hormones semble être différente de celle observée chez le rat.

L'ensemble de ces résultats montre que les hormones thyroïdiennes peuvent réguler la synthèse des VLDL et LDL en modulant la synthèse d'apo B. L'effet majeur de ces hormones réside néanmoins dans une augmentation de la clairance des LDL en augmentant l'expression du gène du récepteur aux LDL.

Chez l'homme, l'hyperthyroïdie est associée à une baisse des concentrations plasmatiques en HDL (Kung et al., 1995), même si les concentrations plasmatiques en apo A-I sont plus élevées que chez les sujets normaux (Kung et al., 1995). La question est de savoir comment les hormones thyroïdiennes agissent sur le métabolisme de ces lipoprotéines. L'hypothyroïdie consécutive à l'administration de propylthiouracile provoque chez le rat une hypercholestérolémie, sans modification des concentrations plasmatiques d'apo A-I et A-IV (Apostopoulos et al., 1987; Staels et al., 1990b). Au niveau hépatique, cela se traduit par une diminution des taux d'ARNm et de la synthèse de l'apo A-IV (Apostopoulos et al., 1987; Staels et al., 1990b; Strobl et al., 1990). Dans le même temps, les taux d'ARNm de l'apo A-I peuvent être soit stables (Staels et al., 1990b) soit diminués (Apostopoulos et al., 1987; Strobl et al., 1990). Par contre, l'administration d'hormones thyroïdiennes chez ces rats augmente les concentrations plasmatiques des apolipoprotéines A-I et A-IV, stimule la synthèse hépatique de ces apolipoprotéines et augmente leur taux d'ARNm dans le foie (Staels et al., 1990b; Davidson et al., 1988). Au niveau hépatique, l'effet des hormones thyroïdiennes sur l'apo A-IV semble être post-transcriptionnel, puisque l'administration d'hormones thyroïdiennes stimule l'expression hépatique d'apo A-IV en diminuant le catabolisme de son ARNm (Lin-Lee et al., 1993).

Au niveau intestinal, l'hypothyroïdie provoque une diminution de la synthèse de l'apo A-I sans modification de son taux d'ARNm (Davidson et al., 1988; Apostopoulos

et al., 1987; Staels et al., 1990b). La synthèse intestinale de l'apo A-IV n'est pas modifiée (Davidson et al., 1988). Le taux d'ARNm de cette apolipoprotéine est soit constant (Davidson et al., 1988; Apostopoulos et al., 1987), soit augmenté (Staels et al., 1990b) après administration de propylthiouracile. Un état hyperthyroïdien provoque, à l'inverse, une augmentation de la synthèse intestinale de l'apo A-I, alors que les taux d'ARNm des apo A-I et A-IV ne sont pas modifiés (Davidson et al., 1988; Staels et al., 1990a; Staels et al., 1990b).

Strobl et al. (1990) ont montré que les hormones thyroïdiennes stimulent rapidement la transcription du gène de l'apo A-I, mais à long terme, la transcription diminue alors que les taux d'ARNm restent élevés. Dans le même temps, les taux d'ARNm de l'apo A-II sont diminués (Staels et al., 1990a; Strobl et al., 1992). Strobl et al. (1992) suggèrent l'existence d'événements post-transcriptionnels augmentant la stabilité de l'ARNm de l'apo A-I et produisant un rétrocontrôle négatif sur la transcription. Plus récemment, il a été montré que les hormones thyroïdiennes augmentent l'expression du gène de l'apo A-I en agissant sur la maturation de l'ARNm de cette apolipoprotéine dans le foie de rat (Soyal et al., 1995). Ces résultats suggèrent que les hormones thyroïdiennes agissent sur les concentrations plasmatiques d'apo A-I à un niveau post-transcriptionnel. Pourtant, l'effet des hormones thyroïdiennes sur le gène de l'apo A-I, pourrait également en partie s'expliquer par la présence d'un élément de réponse à l'hormone thyroïdienne (TRE) situé sur le promoteur de ce gène (Romney et al., 1992). Dans la cellule HepG2, l'administration d'hormones thyroïdiennes provoque une induction des taux d'ARNm de l'apo A-I (Vandenbrouck et al., 1995). Cet effet pourrait expliquer l'augmentation de la concentration plasmatique en apo A-I chez les patients hyperthyroïdiens (Kung et al., 1995). Tout comme chez le rat, les hormones thyroïdiennes interviennent sur la maturation de l'ARNm de l'apo A-I, au niveau post-transcriptionnel (Vandenbrouck et al., 1995).

Ces résultats montrent que les hormones thyroïdiennes peuvent moduler les concentrations plasmatiques de HDL, en régulant l'expression du gène de l'apo A-I et de l'apo A-IV à un niveau peut-être transcriptionnel, mais surtout post-transcriptionnel du gène de l'apo A-II, par un mécanisme encore inconnu à ce jour.

## *Régulation par les hormones stéroïdiennes*

### *Régulation par les corticostéroïdes*

Chez l'homme, un traitement à base de corticostéroïdes, largement utilisés comme agent anti-inflammatoire, provoque des modifications des taux de lipoprotéines plasmatiques pouvant accroître le risque d'athérosclérose (Nashel et al., 1986). En particulier, une augmentation des concentrations en triglycérides et en cholestérol associée à une augmentation des taux plasmatiques de VLDL et LDL est observée (Zimmerman et al., 1984; Ettinger et al., 1987; Berg et Nilsson-Ehle, 1994). Ces hormones pourraient donc agir sur le métabolisme de ces lipoprotéines au niveau de leur synthèse ou de leur catabolisme. Chez le rat, de nombreuses études se sont intéressées à cet effet.

L'administration d'un glucocorticoïde de synthèse, la dexaméthasone, augmente la sécrétion de VLDL hépatique chez le rat (Barlett et Gibbons, 1988). Sur des hépatocytes primaires en culture, il a été montré que la dexaméthasone augmente la synthèse et la sécrétion de triglycérides, ce qui s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion des apolipoprotéines E, B-100 et B-48 dans les VLDL (Martin-Sanz et al., 1990). De plus, la proportion d'ARNm de l'apo B édité n'est pas modifiée par la dexaméthasone (Inui et al., 1992). Les glucocorticoïdes pourraient donc augmenter les concentrations plasmatiques des VLDL en augmentant l'expression hépatique de ses apolipoprotéines constitutives. Néanmoins, dans une étude séparée, il a été montré que les glucocorticoïdes baissent le taux plasmatique en apo B, sans modifier le taux d'ARNm hépatique de cette apolipoprotéine (Staels et al., 1991). Cette différence d'effets pourrait s'expliquer par une différence dans les doses utilisées, puisqu'il est connu que les glucocorticoïdes provoquent des effets différents, selon que leurs concentrations soient physiologiques ou pharmacologiques (Devenport et al., 1989). Alternativement, ce résultat pourrait être expliqué par la différence d'effet des corticostéroïdes naturels et synthétiques (Jansen et al., 1992). Un traitement aux glucocorticoïdes résulte donc en une augmentation des concentrations plasmatiques en VLDL, qui ne semble pas être dépendante d'une augmentation de la transcription du gène de l'apo B, mais d'événements post-transcriptionnels. Par contre, un traitement aux glucocorticoïdes s'accompagne d'une diminution du catabolisme de ces lipoprotéines, puisque la fixation des LDL aux récepteurs est abaissée (Salter et al., 1987).

Chez l'homme, un traitement aux glucocorticoïdes provoque une augmentation des taux plasmatiques de HDL, ce qui, à la vue du rôle protecteur des HDL contre l'athérosclérose, peut représenter un effet bénéfique (Mitamura, 1987). Le mécanisme de cet effet a été étudié chez le rat, chez qui l'administration de glucocorticoïdes, induit une augmentation des taux plasmatiques de HDL, dépendante du corticostéroïde utilisé. En

effet, l'hydrocortisone, corticostéroïde naturel à effet gluco- et minéralo-corticoïde, n'a pas d'effet sur ces taux, par contre, les corticostéroïdes synthétiques, comme la dexaméthasone et la triamcinolone, à effet glucocorticoïde majoritaire, augmentent les taux de HDL (Jansen et al., 1992; Bocharov et al., 1995). Cet effet pourrait être le résultat d'une augmentation de l'expression du gène des apolipoprotéines des HDL, puisque les glucocorticoïdes stimulent la production hépatocytaire des apo A-I et A-IV (Masumoto et al., 1988; Uchida et al., 1991), et augmentent la concentration plasmatique de ces apolipoprotéines (Staels et al., 1991; Inui et al., 1992). De plus, le taux d'ARNm hépatique de l'apo A-I est également augmenté (Elshourbagy et al., 1985a). Cet effet est plus prononcé avec des glucocorticoïdes de synthèse, la dexaméthasone et la triamcinolone, qu'avec le produit naturel, l'hydrocortisone (Staels et al., 1991). Une augmentation du taux d'ARNm de l'apo A-IV a été observée aussi bien au niveau hépatique qu'au niveau intestinal (Staels et al., 1990b). Au niveau hépatique, l'effet induiteur est, tout comme pour l'apo A-I, plus prononcé avec les glucocorticoïdes de synthèse (Staels et al., 1991). Dans le même temps, les taux d'ARNm de l'apo A-II sont réduits au niveau hépatique. L'effet obtenu est équivalent avec les différents glucocorticoïdes testés (Staels et al., 1991). Les glucocorticoïdes semblent donc augmenter les concentrations plasmatiques en HDL, en modulant l'expression des gènes de ses apolipoprotéines.

Chez l'homme, un traitement à la dexaméthasone provoque une augmentation de la concentration plasmatique de l'apo A-I, qui accompagne l'augmentation des taux plasmatiques de HDL (Berg et Nilsson-Ehle, 1994). Cette augmentation résulte principalement dans une augmentation des taux de HDL2. Les auteurs constatent que l'activité de la lipase hépatique (HTGL) est réduite après traitement à la dexaméthasone, ce qui réduirait la régénération des HDL3 (Berg et Nilsson-Ehle, 1994). Cet effet est concordant avec celui obtenu chez le rat par Jansen et al.(1992), qui montrent que la déexaméthasone réduit l'activité et les taux d'ARNm de l'HTGL. De plus, l'augmentation de concentration plasmatique de l'apo A-I pourrait s'expliquer par une augmentation de sa synthèse hépatique. En effet, Il a été montré que la dexaméthasone induit la sécrétion d'apo A-I par des cellules HepG2 en augmentant son taux d'ARNm (Varma et al., 1992). La situation humaine semble donc être similaire à celle observée chez le rat. Cependant, le mécanisme d'action des glucocorticoïdes sur l'expression du gène de l'apo A-I demeure inconnu.

### *Régulation par les oestrogènes*

L'existence d'une différence liée au sexe dans la prévalence du risque cardiovasculaire est bien connue, ainsi que les modifications du métabolisme lipidique lors d'hormonothérapie, dans le cadre de la contraception, ou lors de l'apport

d'oestrogènes pour pallier les conséquences de la ménopause. Des études récentes ont montré une diminution du risque cardiovasculaire sous oestrogènothérapie, lors de la ménopause (Punnonen et al., 1995). De nombreux travaux ont évalué l'effet des oestrogènes sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique.

Chez la femme, après la ménopause, l'administration d'oestrogènes provoque une baisse des taux plasmatiques de LDL et de VLDL (Wolfe et Huff, 1995). Chez des rats ovariectomisés, traités avec de l'éthinyloestradiol, on observe une baisse de la cholestérolémie et de la triglycéridémie. Cette baisse s'accompagne d'une diminution des concentrations plasmatiques des apo B et d'une quasi disparition de l'apo E, sans modification de la synthèse totale, et du taux d'ARNm hépatique de ces apolipoprotéines (Staels et al., 1989 et 1990c). La diminution des concentrations plasmatiques de ces apolipoprotéines ne résulterait donc pas d'une baisse de l'expression de leurs gènes. Cependant, les animaux traités par de l'éthinyloestradiol synthétisent plus d'apo B-100 et moins d'apo B-48 au niveau du foie, ce qui est dû à la diminution de la proportion d'ARNm de l'apo B édité au niveau hépatique (Seishima et al., 1991). Srivastava et al. (1992b; 1995), ont également observé, lors de l'administration de 17 $\beta$ -oestradiol à des souris castrées, une augmentation des rapports apo B100/apo B48 au niveau plasmatique et ARNm apo B100/ARNm apo B48 au niveau hépatique. Les oestrogènes peuvent donc moduler l'édition de l'ARNm de l'apo B au niveau du foie (Srivastava, 1995). En plus de cet effet, un traitement avec de l'éthinyloestradiol, provoque une augmentation du nombre des récepteurs LDL (Windler et al., 1980), résultant d'une augmentation des taux d'ARNm du récepteur aux LDL (Staels et al., 1990c; Srivastava et al., 1993). Ceci favoriserait donc la clairance de ces lipoprotéines, expliquant la baisse de concentrations des apo B et E. Chez l'homme, les oestrogènes provoquent une réduction des concentrations plasmatiques d'apo B (Wolfe et Huff, 1995). Cependant, sur cellules HepG2, il a été montré que le traitement par des oestrogènes ne modifie pas la sécrétion des apolipoprotéines B et E (Tam et al., 1985).

Le traitement aux oestrogènes provoque chez la femme ménopausée, une augmentation des concentrations plasmatiques de HDL (Walsh et Sacks, 1994). Chez l'homme adolescent, si la faible synthèse d'oestradiol est inhibée par voie chimique, les taux plasmatiques de HDL sont diminués. Ces résultats montrent que l'oestradiol pourrait avoir le même effet sur les taux de HDL chez l'homme (Bagatell et al., 1994). La question est de savoir si cet effet s'accompagne d'un modulation de l'expression des gènes codant pour les apolipoprotéines des HDL. Chez le rat ovariectomisé, la teneur plasmatique en apo A-I, ainsi que les taux d'ARNm de cette apolipoprotéine au niveau du foie et de l'intestin, sont augmentés (Staels et al., 1989). L'ovariectomie ne modifie pas la concentration plasmatique et le taux d'ARNm intestinal de l'apo A-IV mais tend à augmenter le taux d'ARNm hépatique de cette apolipoprotéine (Staels et al., 1990b). Si

ces rats sont traités à l'ethinyloestradiol, les taux plasmatiques et le taux d'ARNm hépatique de l'apo A-IV sont diminués, alors que le taux d'ARNm intestinal n'est pas modifié (Staels et al., 1990b). De plus, la concentration plasmatique en apo A-I est abaissée, tandis que le taux d'ARNm de cette apolipoprotéine augmente légèrement dans le foie et diminue dans l'intestin. Les oestrogènes agiraient donc en aval de la transcription pour influencer la synthèse de l'apo A-I, mais ils interviendraient également dans le catabolisme de cette apolipoprotéine (Staels et al., 1989).

L'administration de  $17\alpha$ -éthinyloestradiol à des rats mâles provoque, de façon similaire, une hypocholestérolémie associée à une baisse des apolipoprotéines A-I et A-IV plasmatiques. La baisse d'apo A-IV plasmatique se traduit par une baisse du taux d'ARNm hépatique de l'apo A-IV. Dans le même temps, ce taux est induit au niveau intestinal (Srivastava et al., 1994). Par contre, si l'apo A-I plasmatique diminue, le taux d'ARNm de l'apo A-I, ainsi que son taux de synthèse au niveau du foie sont augmentés (Seishima et al., 1991). Chez les souris castrées, la testostérone stimule la synthèse de l'apo A-I tandis que les oestrogènes, à doses pharmacologiques, la diminuent. Cependant, les taux d'ARNm de cette apolipoprotéine ne sont pas modifiés, ce qui suggère que les hormones stéroïdiennes agissent essentiellement en modulant la synthèse de l'apo A-I à un niveau post-transcriptionnel (Tang et al., 1991a et 1991b). Sur des cellules HepG2, un traitement aux oestrogènes provoque une augmentation de la sécrétion de l'apo A-I, qui résulte d'une augmentation du taux d'ARNm de cette apolipoprotéine (Tam et al., 1985; Archer et al., 1986). Cet effet peut être contrebalancé par la testostérone (Tam et al., 1985). Ces résultats montrent que dans ces cellules, tout comme chez le rat, les taux d'ARNm de l'apo A-I sont augmentés après traitement aux oestrogènes. L'augmentation de la sécrétion observée dans ces cellules pourrait résulter de l'absence dans ces cellules, du mécanisme post-transcriptionnel amenant à la baisse de synthèse de l'apo A-I.

L'ensemble de ces résultats montre que les oestrogènes peuvent moduler les concentrations plasmatiques de HDL en régulant l'expression du gène de l'apo A-I à un niveau post-transcriptionnel.

### *Régulation par les rétinoides*

La vitamine A (rétilnol) et ses dérivés, les rétinoides sont nécessaires au fonctionnement de l'organisme. Ces produits agissent en se fixant sur des récepteurs nucléaires spécifiques, les RXR et les RAR. Ces récepteurs sont de type II, et ne nécessitent donc pas forcément la fixation de leur ligand, qui sont l'acide all-trans rétinoïque pour le RAR et le 9-cis acide rétinoïque, qui se fixe préférentiellement sur le RXR. Ces récepteurs se fixent ensuite sur un élément de réponse situé dans le promoteur

de leurs gènes cibles, appelé Retinoic Acid Responsive Element (RARE) (pour revue, Love et Gudas, 1994).

Il n'existe, à notre connaissance, que très peu de données sur l'effet de ces composés sur le métabolisme lipidique. Néanmoins quelques études ont permis de mettre en évidence un effet de ses produits sur l'expression du gène de l'apo A-I. En effet dans la cellule HepG2, il a été montré que le promoteur du gène de l'apo A-I contenait un élément de réponse aux rétinoides. Le RXR est plus actif que le RAR pour cet effet (Rottman et al., 1991). De plus, l'acide rétinoïque et le RXR lèvent l'inhibition apportée par ARP-1, un facteur de transcription se fixant sur le même promoteur pour réprimer l'expression du gène de l'apo A-I. Ces résultats montrent que les rétinoides activent l'expression du gène de l'apo A-I. Ces résultats ont été étendus à l'effet des rétinoides sur la synthèse de l'apo A-I. En effet sur des cultures primaires d'hépatocytes de primates, un traitement à l'acide rétinoïque provoque une augmentation de l'expression du gène de l'apo A-I, qui s'accompagne d'une induction de la sécrétion de cette apolipoprotéine (Kaptein et al., 1993). Dans la même expérience, le gène de l'apo B ne présente aucune variation, ni en transcription, ni en sécrétion (Kaptein et al., 1993). Ces résultats ont été reproduits dans des cultures primaires d'hépatocytes de rat par Berthou et al. (1994), qui montrent que l'acide rétinoïque induit la transcription du gène de l'apo A-I et la sécrétion de cette apolipoprotéine, mais n'a pas d'effets sur l'apo A-II. Par contre, *in vivo*, un traitement à l'acide rétinoïque chez le rat, provoque une baisse des taux d'ARNm de l'apo A-I, sans changer sa sécrétion (Berthou et al., 1994). L'ensemble de ces résultats montre que l'acide rétinoïque active l'expression du gène de l'apo A-I et augmente la sécrétion de cette apolipoprotéine *in vitro*. Par contre, *in vivo*, l'effet est opposé et ne s'accompagne pas de changements dans la sécrétion de l'apo A-I, suggérant l'existence de mécanismes additionnels. Il semble donc que les rétinoides n'aient pas d'effets très prononcés sur le métabolisme des HDL.

#### *Régulation par les récepteurs nucléaires orphelins*

Les récepteurs nucléaires orphelins pourraient avoir des effets sur le métabolisme lipoprotéique, en régulant les gènes impliqués dans ce métabolisme.

Actuellement, le plus étudié d'entr'eux, le Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR), a été montré comme intervenant dans la régulation du métabolisme lipidique en régulant les gènes codant pour les enzymes clés de la chaîne de  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomale, qui permet la dégradation des acides gras par oxydation. Ce récepteur a d'ailleurs récemment quitté la famille des récepteurs orphelins, puisque deux ligands lui ont été identifiés ; les thiazolidinediones (Lehmann et al., 1995) et une prostaglandine (Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995). En plus de ces effets sur les gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras, le PPAR semble jouer un rôle dans

la régulation des gènes du métabolisme lipoprotéique : le PPAR lève l'inhibition de la transcription du gène de l'apo A-I obtenu après traitement au fénofibrate (Vu Dac et al., 1994). Il médie également l'activation du gène de l'apolipoprotéine A-II par les fibrates (Vu Dac et al., 1995) et l'inhinition du gène de l'apolipoprotéine C-III par les fibrates (Hertz et al., 1995). Enfin, le PPAR est capable d'activer le gène de la lipoprotéine lipase (LPL), responsable de la dégradation des triglycérides (Schoonjans et al., 1995).

L'ARP-1 (Apolipoprotein A-I Regulatory Protein 1) se fixe sur un site spécifique du gène de l'apolipoprotéine A-I et inhibe l'expression de ce gène. Ce facteur est en compétition avec le récepteur à l'acide rétinoïque (RXR) qui lui, active le gène de l'apo A-I (Widom et al., 1992). Un autre récepteur orphelin, le HNF-4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4) est responsable chez l'homme et le rat, d'une induction de l'expression du gène de l'apo A-I au niveau hépatique, mais pas intestinal (Ginsburg et al., 1995; Chan et al., 1993). L'HNF-4 a également été montré comme activant la transcription du gène des apo A-II, B et C-III (Ladias et al., 1992). La transcription de ces mêmes gènes est par contre inhibée par d'autres membres de la famille des récepteurs nucléaires orphelins comme l'ARP-1, l'EAR-2 et l'EAR-3 (Ladias et al., 1992).

#### A.2.2.2. Hormones agissant par des récepteurs membranaires

##### *Régulation par l'insuline*

Compte tenu du rôle lipogénique de l'insuline, il apparaît évident que cette hormone puisse jouer un rôle dans le métabolisme lipoprotéique. Les relations entre le diabète et les lipides plasmatiques sont connues depuis longtemps, puisque cette maladie est souvent accompagnée d'une hyperlipémie et d'un hypertriglycéridémie.

Dans le diabète insulino-dépendant (IDDM), lorsque le déficit en insuline est important, une élévation des taux plasmatiques de VLDL est observée. Ce phénomène résulte principalement de deux mécanismes. L'insuline est une hormone antilipolytique, agissant au niveau de la cellule adipeuse pour inhiber l'activité de la lipase hormono-sensible (HSL), responsable de l'hydrolyse des triglycérides en acides gras et glycérol. Lorsque l'insuline n'est pas présente, l'activité de l'HSL est induite, ce qui provoque une augmentation de la concentration des acides gras libres (Stralfors et al., 1984). Cette augmentation de concentration en acides gras libres provoque une augmentation de la sécrétion des VLDL au niveau hépatique (Howard, 1987). De plus, l'activité de la LPL est réduite, ce qui diminue le catabolisme de ces lipoprotéines (Howard, 1987). L'augmentation de synthèse des VLDL pourrait résulter d'une augmentation de synthèse d'apo B, néanmoins, les résultats obtenus chez le rat sont complexes. Dans des hépatocytes de rat, l'insuline provoque deux effets distincts, dépendants de la durée du traitement. Un traitement à court terme (4 à 24 heures) sur des hépatocytes de rat,

provoque une diminution de la sécrétion des VLDL. Cette baisse s'accompagne d'une diminution de la synthèse et la sécrétion des apo B-48, B-100 et E (Sparks et al., 1986). Par contre, un traitement à long terme (supérieur à 24 heures) provoque une augmentation de la sécrétion des VLDL (Barlett et Gibbons, 1988). Sparks et al. (1988), proposent que l'insuline aurait un rôle double sur le métabolisme de ces lipoprotéines. D'abord, maintenir la sécrétion d'apo B et des VLDL à un taux de base. Ensuite, inhiber la sécrétion hépatique d'apo B, en période post-prandiale où les concentrations d'insuline sont élevées (Sparks et al., 1988). Dans des hépatocytes de rat, un traitement à l'insuline à court terme, stimule la dégradation de l'apo B, en particulier l'apo B-100 (Sparks et Sparks, 1990), mais par contre, augmente la synthèse et la sécrétion d'apo B-48 (Thorngate et al., 1994). Cette augmentation est due à une régulation du mécanisme d'édition de l'apo B par l'insuline, favorisant la synthèse d'apo B-48 par rapport à l'apo B-100 (Thorngate et al., 1994). Sur des cellules HepG2, à court terme, l'insuline inhibe la sécrétion des triglycérides et des apo B et E, sans qu'il y ait modification du taux d'ARNm de ces apolipoprotéines (Pullinger et al., 1989; Dashti et al., 1989; Ogbonna et al., 1993). La baisse de sécrétion de l'apo B peut s'expliquer par l'inhibition de la traduction de l'apo B-100 au niveau hépatique (Thorngate et al., 1994).

Chez l'homme, l'augmentation des concentrations d'insuline, provoque une diminution des concentrations plasmatiques d'HDL (Modan et al., 1988). Cette diminution résulte principalement de la réduction des concentrations plasmatiques en HDL2. Després et al. (1995) propose que ce phénomène pourrait être attribué à l'augmentation de l'activité de la lipase hépatique (HTGL) observée *in vivo* en cas d'hyperinsulinémie (Després et al., 1989). L'insuline pourrait également avoir des effets sur l'expression des gènes des apolipoprotéines contenues dans les HDL. Ceci est le cas, mais là aussi, la durée du traitement à l'insuline est importante. Des hépatocytes de rat traités pendant 12 heures à l'insuline, présentent un diminution de la synthèse et de la sécrétion des apo A-I et A-IV (Masumoto et al., 1988; Uchida et al., 1991). Par contre, un traitement plus long, 4 jours, provoque une augmentation des taux d'ARNm de ces apolipoprotéines (Elshourbagy et al., 1985a). Ces résultat dissocient l'action chronique et l'action aigue de l'insuline. Dans les cellules HepG2, l'insuline, à court terme, diminue également la sécrétion de l'apo A-I, sans modifier son taux d'ARNm (Dashti et al., 1989). Les mécanismes régissant cette régulation demeurent néanmoins inconnus.

Ces résultats montrent que, si les mécanismes régissant l'effet de l'insuline sur le métabolisme des triglycérides et des VLDL commencent à être élucidés, beaucoup reste à faire concernant l'effet de cette hormone sur le métabolisme des HDL.

### *Régulation par le glucagon*

Le glucagon posséde des propriétés hypolipémiantes, bien que son action sur le métabolisme lipoprotéique soit mal connu.

Chez le rat, l'administration chronique de glucagon diminue la concentration plasmatique en triglycérides, cholestérol et phospholipides (Guettet et al., 1989). La teneur en triglycérides dans les chylomicrons et les VLDL est abaissée, probablement via un effet activateur de cette hormone sur le catabolisme de ces lipoprotéines (Guettet et al., 1991). Le glucagon augmente également l'activité du récepteur aux LDL, sans augmenter ses taux d'ARNm hépatiques et augmente les taux d'ARNm hépatiques des apo B (Rudling et Angelin, 1993) et E (Mangeney et al., 1989). Deux études réalisées sur hépatocytes primaires de rat, reportent également un effet inhibiteur du glucagon sur la production des apo A-I (Masumoto et al., 1988) et A-IV (Uchida et al., 1991). Concernant les mécanismes d'action du glucagon, il est évident que beaucoup reste à faire.

### A.2.3. Régulation par les agents pharmacologiques

#### *Régulation par les statines*

Les statines appartiennent à une classe de molécules pharmacologiques à action hypolipémante. Les principales statines sont la lovastatine, la simvastatine, la pravastatine, l'atorvastatine et la fluvastatine. Les statines possèdent toutes le même effet, qui est d'inhiber la néosynthèse de cholestérol en inhibant une enzyme clé de cette voie de néosynthèse, l'enzyme microsomale 3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) reductase. Les statines, en plus de cet effet, ont d'autres effets additionnels, dépendants de la molécule.

Chez l'homme hypercholestérolémique, la pravastatine, baisse la concentration plasmatique de cholestérol, les taux de VLDL, de LDL et d'apo B (Galetta et al., 1994). Cependant, ce traitement n'affecte pas la production d'apo B (Parhofer et al., 1993). Ces auteurs suggèrent que cette baisse est le résultat d'un catabolisme accru de ces lipoprotéines (Parhofer et al., 1993). Une autre statine, la fluvastatine provoque également une diminution des concentrations plasmatiques des lipoprotéines contenant de l'apo B, ce qui pourrait confirmer l'hypothèse du catabolisme accru (Dallongeville et al., 1994). Les études visant à élucider le mécanisme d'action de ces produits ont été limitées chez le rat, puisque chez cet animal, les statines ne provoquent pas de baisse du cholestérol plasmatique. Ces animaux répondent au traitement par les statines en augmentant l'activité enzymatique de l'HMG-CoA reductase (Endo et al., 1978). Néanmoins, chez le rat hypercholestérolémique, l'administration de lovastatine provoque

une diminution des concentrations plasmatiques de VLDL. Cette baisse ne s'accompagne pas d'une baisse des concentrations en apo B (Kasim et al., 1993). La simvastatine produit le même effet sur les taux de VLDL, mais produit en plus, une légère baisse des taux d'ARNm de l'apo B (Van Tol et al., 1991). Par contre, chez des rats "normaux", la simvastatine provoque une diminution des concentrations plasmatiques en apo B, accompagnée d'une baisse des taux d'ARNm de cette apolipoprotéine (Mitchell et al., 1993). Ces résultats pourraient suggérer un déficit dans la réponse à ces médicaments chez le rat hypercholestérolémique.

Chez l'homme, la pravastatine possède un léger effet activateur sur les concentrations plasmatiques en HDL. Cette augmentation est due principalement à une élévation des concentrations en LpAI:AII, mais pas en LpAI (Cheung et al., 1993). Par contre, la fluvastatine a un effet plus prononcé sur l'augmentation des taux de HDL, en produisant une augmentation des concentrations plasmatiques en LpAI, dont l'effet protecteur sur l'athérosclérose est bien établi (Dallongeville et al., 1994). Chez le rat hypercholestérolémique, la pravastatine n'a pas d'effet sur la sécrétion des apo A-I, A-IV, B et E (Van Tol et al., 1991). Par contre, la simvastatine administrée à des rats, provoque une baisse de la sécrétion hépatique des apo A-I, A-IV et E (Felgines et al., 1994). Cette baisse de sécrétion est accompagnée d'une baisse des taux hépatiques des taux d'ARNm des apo A-IV et E (Felgines et al., 1994), mais pas ceux de l'apo A-I, qui eux, sont induits par la simvastatine (Mitchell et al., 1993). Ceci suggère l'existence d'événements post-transcriptionnels expliquant la baisse de sécrétion de cette apolipoprotéine.

L'ensemble de ces résultats montre que les statines, malgré leur effet hypcholestérolémiant commun, ont des effets additionnels, qui diffèrent selon les molécules. Beaucoup reste donc à faire pour comprendre les mécanismes d'action de ces produits et sur la manière de contrôler leurs effets.

#### *Régulation par les fibrates*

Les fibrates, comme les statines sont des produits hypolipémiants dont les principaux représentants sont le clofibrate, le fénofibrate, le bézafibrate, le beclofibrate, le ciprofibrate, l'etofibrate et un membre relatif, le gemfibrozil.

Les fibrates diminuent les concentrations plasmatiques des triglycérides et baissent les LDL chez les patients à taux de LDL élevé. Les taux plasmatiques d'apo B sont généralement diminués, particulièrement dans le cas où le taux de LDL du patient est élevé (Fruchart et al., 1987). Les LDL étant le produit de l'hydrolyse des VLDL, la diminution de l'expression de l'apo B, pourrait résulter en une diminution des taux de

LDL. A l'inverse, probablement pour la même raison, si le niveau de base des LDL est bas, alors, les taux plasmatiques d'apo B peuvent être augmentés (Shepherd et al., 1985). Chez le rat, un traitement aux fibrates diminuent les taux plasmatiques de VLDL, en particulier en favorisant le catabolisme de ces particules riches en triglycérides, par l'intermédiaire d'une activité enzymatique accrue (Heller et Harvengt, 1983) et d'une augmentation des taux d'ARNm (Staels et Auwerx, 1992) de la LPL. De plus, tout comme les acides gras, les fibrates sont de puissants activateurs des PPAR. Or, ce facteur a été récemment montré comme médiant l'effet des fibrates via une action directe sur le gène de la LPL (Schoonjans et al., 1995). La baisse d'expression du gène de l'apo C-III, dont une des fonctions principales est d'inhiber l'activité de la LPL, observée après traitement aux fibrates pourrait également contribuer au catabolisme accru des VLDL (Staels et al., 1995). Enfin, les fibrates diminuent l'activité de l'acetyl-CoA carboxylase qui est l'enzyme limitante dans la chaîne de synthèse des triglycérides (Maragandakis et Hankin, 1971). Ceci apporterait l'idée que les fibrates pourraient également contribuer à baisser la sécrétion des triglycérides. En résumé les fibrates exercent leurs effets principalement en augmentant la clairance des VLDL, et probablement en diminuant leur synthèse.

Chez l'homme, les fibrates augmentent les taux de HDL chez les patients à taux de HDL bas (Balfour et al., 1990). Cette augmentation s'accompagne d'une augmentation des concentrations plasmatiques en apo A-I et A-II (Mellies et al., 1987), ce qui est confirmé par l'augmentation des concentrations plasmatiques en LpAI:AI observée après traitement aux fibrates (Bard et al., 1992). Par contre, chez le rat, contrairement à la situation observée chez l'humain, l'administration de fibrates provoque une diminution des taux plasmatiques de HDL (Staels et al., 1992). En parallèle à ces changements, des régulations existent également sur l'expression des gènes des apolipoprotéines. Ainsi, après traitement aux fibrates, l'expression hépatique des gènes des apo A-I et A-II et A-IV est diminuée, alors que celle des gènes de l'apo E ne présente pas de variations significatives (Staels et al., 1992). Cette diminution est liée à une diminution de la transcription de ces gènes pour les apo A-I et A-IV (Staels et al., 1992). Chez le rat, l'effet des fibrates est donc inverse à celui observé chez l'homme. Néanmoins, le mécanisme expliquant cette différence demeure à élucider.

## B. L'OBÉSITÉ

L'obésité est un problème de santé majeur dans les pays industrialisés. Cette maladie touche un nombre croissant de personnes dans le monde (Martin et al., 1995). Au sens le plus large, l'obésité se caractérise par un désordre de la balance énergétique, amenant à une accumulation anormalement élevée de tissu adipeux.

Chez l'humain, l'obésité est une maladie d'origine hétérogène, dont le développement implique des composantes environnementales et génétiques. Ces composantes affectent les entrées et/ou les dépenses d'énergie par le biais de dysrégulation sur les mécanismes régissant la prise de nourriture ou le stockage de lipides.

Dans les sociétés industrialisées, l'abondance et la qualité de la nourriture amènent à un accroissement de la quantité de nourriture ingérée. De plus, le niveau d'activité physique est réduit, ce qui provoque une diminution de la dépense énergétique. Ces phénomènes, associés à une prédisposition génétique, favorisent le développement de l'obésité (Bouchard, 1991).

Afin de mieux cerner le problème de l'obésité, il apparaît donc important de comprendre les mécanismes qui régissent le comportement alimentaire et le métabolisme énergétique. Nous verrons ensuite, que la recherche actuelle s'oriente vers la connaissance des gènes impliqués dans ces mécanismes, et de leurs régulations.

### B.1. Aspects cliniques de l'obésité

D'une manière générale, on peut distinguer deux grands types d'obésité : l'obésité hypertrophique et l'obésité hyperplastique. L'obésité hypertrophique se caractérise par une augmentation en masse des cellules adipeuses. L'obésité hyperplastique se traduit par une augmentation du nombre des cellules adipeuses. Cette deuxième forme est le plus souvent associée à un développement précoce de l'obésité. La forme sévère de l'obésité double le risque de mortalité et augmente le risque de mortalité dû au diabète (Walker, 1995), aux accidents cérébro- et cardio-vasculaires (Barrett-Connor, 1985) et même à certaines formes de cancer (Deslypere, 1995). Ces associations ont été mises en évidence grâce à l'utilisation de techniques, que nous allons maintenant brièvement décrire, permettant de mesurer l'obésité.

#### B.1.1. Méthodes

Il existe plusieurs méthodes pour quantifier l'obésité. Ces méthodes consistent à mesurer la quantité et la distribution de tissu adipeux dans le corps. Dans ce domaine, plusieurs techniques ont été mises au point :

- Technique de composition corporelle indirecte

Cette technique consiste simplement, par des dosages biochimiques, à quantifier la quantité de tissu adipeux total dans le corps par rapport à la quantité de tissu non graisseux (Forbes et al., 1961; Sheng et Huggins, 1979). Les mesures obtenues sont variables selon le sexe, la race, l'age et le degré d'obésité. De ce fait, cette technique ne peut s'appliquer qu'à une population limitée.

- Technique de composition corporelle semi-directe (Computer Tomography)

Des scans multiples sont effectués sur une partie ou sur le corps complet. Après intégration informatique, il est possible de mettre en évidence les zones où le tissu adipeux est représenté (Borkan et al., 1982). Cette technique donne l'avantage de montrer la distribution du tissu adipeux dans le corps. En particulier, c'est par cette technique qu'il a été montré que le risque d'accident cardio-vasculaire était associé avec une accumulation de graisse au niveau abdominal (Borkan et al., 1982).

- Mesures anthropométriques

Les deux mesures les plus couramment utilisées sont la mesure du "Body Mass Index" (BMI) et du "Waist and Hip ratio". Le BMI est obtenu simplement en divisant le poids total du corps par le carré de la taille en mètre ( $\text{Kg}/\text{m}^2$ ). Le Waist and Hip ratio s'obtient en calculant le rapport tour de taille sur tour de hanche. L'avantage de ces deux techniques, c'est leur simplicité. Elles permettent donc d'effectuer des études à grande échelle, offrant de meilleures données statistiques.

### B.1.2. Traitement de l'obésité

Les techniques de mesure de poids et de distribution de tissu adipeux citées précédemment, vont orienter le clinicien vers un traitement adapté à chaque type d'obésité. Pour optimaliser son traitement, le clinicien devra rajouter à ces mesures une détection d'autres maladies associées à l'obésité (diabète ou athérosclérose, par exemple) ainsi qu'une collecte d'informations liées au comportement du malade. De manière générale, le traitement va consister à provoquer une perte durable de poids chez le malade, afin de le ramener à un poids idéal déterminé selon la taille, l'âge et le sexe du patient, ainsi qu'à apporter un soutien psychologique au patient pour le conforter dans son traitement (pour revue voir Brownell et Wadden, 1991).

Si le physiologiste dissocie une obésité hyperplastique et une obésité hypertrophique, le clinicien lui, dissocie trois formes d'obésité : légère, modérée et sévère.

Dans les obésités légères (BMI proche de  $\text{Kg}/\text{m}^2$ ), le traitement s'appuie sur un apprentissage du contrôle du comportement alimentaire et physique du patient (Stuart, 1967). Ce traitement consiste à aider le patient à réduire ses prises de nourriture, à absorber une nourriture plus équilibrée (apport énergétique) et à augmenter son activité

physique (dépense énergétique). Ce traitement est préventif du développement des maladies associées. Cependant, dans la majorité des cas, la perte de poids observée n'est pas durable (Kramer et al., 1989).

Pour les obésités modérées ( $30 < \text{BMI} < 35 \text{ Kg/m}^2$ ), le traitement consiste à apporter un régime peu calorique au patient (Apfelbaum, 1967; Vertes et al., 1977). Ce traitement, comme le précédent, n'apporte pas de résultats durables puisque les patients regagnent leur poids initial dans les mois suivants le traitement (Sikand et al., 1988).

Pour les obésités sévères ( $\text{BMI} > 35 \text{ kg/m}^2$ ), qui touche environ 0,5 % de la population aux États Unis (Kuczmarski, 1992), lorsque le traitement par les régimes est inefficace, une intervention chirurgicale s'impose. Cette intervention consiste à réduire la taille de l'estomac ou à réduire sa capacité, ce qui diminue la faim, provoque une prise de nourriture réduite chez le malade et restaure la sensation de satiété (Valley et Grace, 1987).

En plus de ces traitements, de nombreux médicaments ont été développés. Ces médicaments agissent pour la plupart sur la régulation de l'appétit et de la prise de nourriture. On distingue deux grandes classes de molécules pharmacologiques : celles agissant au niveau du système de neurotransmetteurs du type catécholamines et celles qui agissent au niveau du système sérotoninergique. La combinaison des deux types de molécules pourrait être plus efficace (Weintraub et al., 1983). Parmi les molécules agissant sur la voie des catécholamines, nous pouvons citer le diethylpropion (Silverstone et al., 1968), la phentermine (Silverstone, 1972), le mazindol (Silverstone et Kyriakides, 1982) et la phenylpropanolamine (Altschuler et al., 1982) qui agissent sur le système nerveux sympathique, provoquant une diminution de la prise de nourriture. Pour les molécules agissant au niveau de la voie sérotoninergique, citons la fenfluramine (Fink et al., 1971), la dexfenfluramine, deux fois plus actif que le précédent (Goodall et al., 1992) et la fluoxétine (McGuirk et Silverstone, 1990) qui provoque une baisse de la prise de nourriture. Les mécanismes régissant l'action de la voie sérotoninergique et des catécholamines seront développés de manière plus détaillée ultérieurement.

Synthétiquement, nous voyons que la principale manière de traiter l'obésité passe par une régulation au niveau du comportement alimentaire. Dans les cas extrêmes, l'intervention chirurgicale peut s'avérer nécessaire. Même si certaines molécules sont mises sur le marché, leur efficacité à long terme reste à démontrer.

### B.1.3. Les modèles animaux d'obésité

Devant les difficultés présentées par les études cliniques sur l'homme, il est donc nécessaire de posséder des modèles animaux d'étude. Les rongeurs ont été, et sont encore de nos jours, les animaux de laboratoire les plus couramment utilisés pour l'étude de l'obésité. De nombreux modèles d'obésité existent. Dans ces modèles, les obésités

sont soient induites, soient génétiques. Les obésités induites les plus utilisées sont représentées table 2 :

Nutritionnelles	Chirurgicales	Chimiques
Régimes riches en lipides	Lésion des noyaux ventromédians de l'hypothalamus	Aurothioglucose
Régimes riches en saccharose	Lésion des noyaux latéraux de l'hypothalamus	
Régimes "Cafétéria"		

Table 2 : Les obésités induites

Des régimes riches en lipides induisent l'obésité chez le rat (Mickelsen et al., 1955). Cela s'explique par le trop grand apport calorique reçu par l'animal. Ne pouvant utiliser toute cette énergie, l'animal la stocke sous forme de lipides dans le tissu adipeux. C'est pourquoi, chez ces animaux, on observe une hypertrophie et une hyperplastie des cellules adipeuses (Corbett et al., 1986). Ce type d'obésité induite est réversible, après retour à un régime plus équilibré, c'est-à-dire moins riche en lipides. Néanmoins, il est à noter que lors de ce phénomène, c'est la quantité de lipides dans les cellules adipeuses qui diminue, et non le nombre de cellules (Corbett et al., 1986).

L'efficacité pour induire l'obésité dépend du type de lipides apportés. Les lipides apportés sous forme solide sont plus efficaces que les lipides apportés sous forme liquide, ce qui est probablement dû à leur plus grande attractivité. De plus, les acides gras alimentaires à chaîne longue sont plus efficaces que les acides gras à chaîne courte. Enfin, la composition en carbohydrates de ces régimes est un élément déterminant (Ramirez et Friedman, 1990). L'ajout de carbohydrates simples dans les régimes hyperlipidiques est nécessaire afin que la cellule adipeuse puisse synthétiser les triglycérides, forme principale de stockage des lipides. D'ailleurs, lorsque un régime hypercalorique riche en carbohydrates est donné à l'animal, en présence de lipides, l'obésité est également induite chez cet animal (Sclafani, 1987). Dans ces régimes, l'utilisation de glucides simples, en particulier le saccharose, apportent de meilleurs résultats qu'avec les glucides complexes. Ceci est lié à une utilisation facilitée du glucose et du fructose libéré, dans la lipogenèse.

Ces résultats montrent qu'une surnutrition riche en lipides et en carbohydrates est responsable du développement de l'obésité. Ceci peut expliquer pourquoi chez l'homme, l'obésité se développe beaucoup dans les pays riches, là où la nourriture est variée et très abondante. Ceci est confirmé par l'utilisation des régimes "cafétérias" chez le rat. Ces régimes sont les plus efficaces pour induire l'obésité. Il consiste à apporter à l'animal différents repas journalier, riches en carbohydrates, lipides, protéines (produits de supermarché comme le chocalat, du fromage, du beurre de cacahuètes, etc...) et à varier ces repas quotidiennement, toujours en gardant un apport hypercalorique. Cette variété apporte une surconsommation de nourriture et donc l'obésité (Rolls, 1979).

D'autres obésités induites ont permis de fournir de bons modèles d'étude. C'est le cas des obésités induites par intervention chirurgicale. Lorsque la partie ventromédiane de l'hypothalamus (VMH) est retirée, l'animal est sujet à une surnutrition qui amène à l'obésité. Il est fort probable que cette lésion affecte la régulation par les stimuli externes et internes intervenant dans le contrôle de l'arrêt de la prise de nourriture. Chez ces animaux, en plus de l'hyperphagie, une hyperinsulinémie apparaît (Bray, 1985). Des résultats identiques sont obtenus en utilisant l'aurothioglucose.

Inversement, la lésion de la partie latérale de l'hypothalamus chez le rat (LH) provoque une réduction de la prise de nourriture et des problèmes de régulation pondérale. L'importance du déficit dépend du degré de dégradation de la voie de la dopamine au niveau du striatum et des noyaux accumbens du cerveau. La stimulation électrique de cette zone du cerveau provoque par contre, une surnutrition pouvant amener à l'obésité.

D'autres modèles animaux ont été utilisés dans le cadre de l'obésité. C'est le cas des obésités génétiques présentes chez certains animaux dont la mutation ou l'absence d'un gène clé prédispose au développement de l'obésité. Ces modèles seront développés ultérieurement.

## B.2. Le métabolisme énergétique

### B.2.1. Aspect physiologique du métabolisme énergétique

Historiquement, on pensait que l'obésité provenait d'un problème comportemental qui amenait à une consommation exagérée de nourriture. C'est pourquoi les traitements contre l'obésité ont dans un premier temps consisté à rétablir une prise de nourriture normale. Ces traitements se sont avérés inefficaces, montrant qu'il ne suffisait pas de réduire l'apport énergétique pour rééquilibrer la balance.

La cellule adipeuse est au cœur de cette balance énergétique. Cette cellule est adaptée à sa fonction majeure, qui est le stockage et la libération d'énergie. En cas de stockage d'énergie, les groupements glycerophosphates libérés par glycolyse se couplent

aux acides gras libres pour former des triglycérides, forme de stockage des lipides dans le tissu adipeux blanc. En cas de besoin énergétique, ces triglycérides sont hydrolysés, libérant ainsi du glycérol et des acides gras libres. Ces acides gras vont être transportés aux organes ayant besoin d'énergie pour y être oxydés. Le métabolisme de la cellule adipeuse est représenté figure 4.

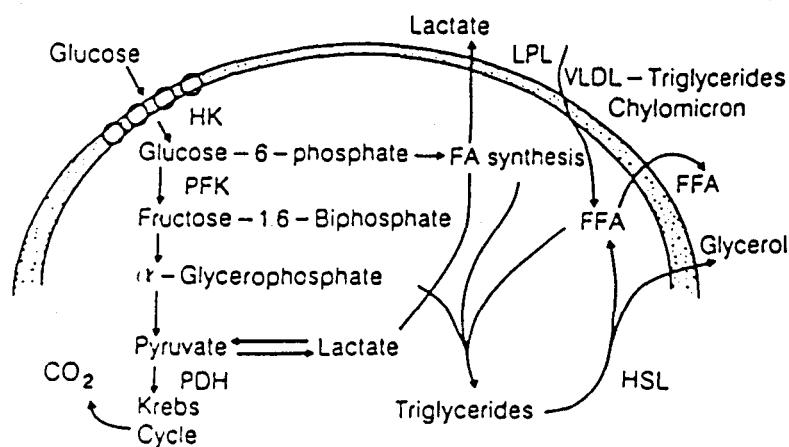


Figure 4 : Le métabolisme de la cellule adipeuse (Lönnroth et Smith, 1992)

L'insuline joue un rôle fondamental dans le métabolisme de la cellule adipeuse en augmentant l'apport intracellulaire de glucose (Cushmann et Wardzala, 1980), favorisant la synthèse de triglycérides. L'insuline exerce un effet anti-lipolytique en inhibant l'activité de la lipase hormono-sensible (Stralfors, 1984). L'activité de cette hormone est l'étape limitante dans la régulation de la lipolyse de la cellule adipeuse. Elle est liée aux taux intracellulaires d'AMP cyclique. Le niveau de ce messager est lui-même régulé par divers agents hormonaux à action rapide. Les catécholamines, par action sur des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques augmentent l'activité de la lipase hormono-sensible. D'autres facteurs l'inhibent. Outre l'insuline, le neuropeptide Y, les prostaglandines, l'adénosine et les catécholamines, par action sur des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques inhibent l'activité de la lipase hormono-sensible (pour revue, Berlan et al., 1995).

La cellule adipeuse se présente donc comme un organe essentiel dans la balance énergétique. Elle permet d'apporter de l'énergie en cas de besoin, ou d'en stocker en cas d'excès, comme c'est le cas chez l'obèse. Cette balance est fonction de la prise alimentaire qui détermine la quantité d'énergie apportée et de la capacité de l'organisme à dépenser cette énergie (figure 5).

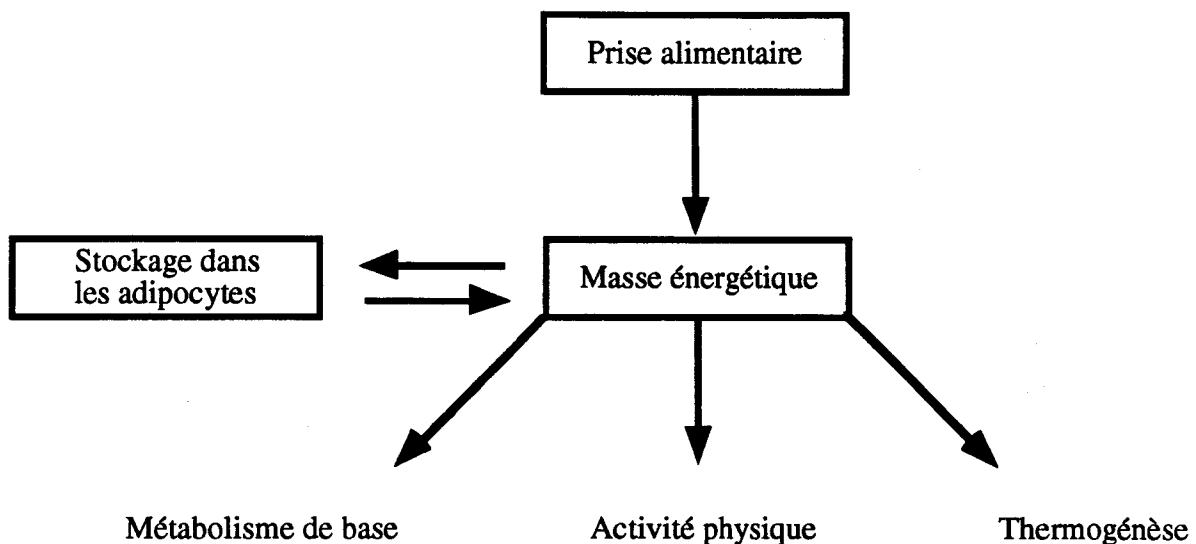


Fig 5 : Représentation schématique de la balance énergétique

### B.2.2. La dépense énergétique

Comme le montre la figure 5, il existe trois voies principales de dépense énergétique. Tout d'abord, la quantité d'énergie nécessaire au fonctionnement des organes, c'est-à-dire nécessaire au métabolisme de base, appelé "Resting Metabolic Rate" (RMR). Le RMR représente environ 60-70% de la dépense énergétique journalière. Ensuite, l'effet thermique dû à la nourriture, qui représente environ 10% de la dépense totale. Enfin, l'activité physique, qui représente 20-30% de la dépense. L'obésité provoque une baisse de la dépense énergétique. Il est donc important de connaître l'implication de chacune des trois composantes de la dépense énergétique afin de savoir pourquoi l'obèse a une dépense énergétique plus faible.

#### - Le RMR

Plus un animal est grand, plus son besoin énergétique est grand (Kleiber, 1975). Le RMR est fonction du logarithme de poids de corps. C'est l'équation de Kleiber (Kleiber, 1975). Cette équation permet de calculer le RMR attendu d'un animal en fonction de son poids. Le RMR permet à l'animal de conserver son équilibre énergétique par rapport à son propre poids. L'équation de Kleiber a amené la notion de poids idéal ou "set point" que l'on peut calculer pour un animal dans une espèce donnée.

"Empiriquement", ceci a permis d'évaluer la relation existante entre le RMR et l'obésité en comparant cette régulation chez des sujets normaux et obéses. Si on force un rat à maigrir, en réduisant sa prise alimentaire, sa dépense énergétique est inférieure à celle attendue par l'équation de Kleiber (Corbett et al., 1985). Des animaux sur lesquels

l'obésité a été induite par une nourriture hyperlipidique, présentent une augmentation du poids corporel de 26% supérieure à celle des contrôles (Corbett et al., 1986). Ces animaux ont, en outre, réajustés leur RMR à un niveau plus élevé, correspondant à leur nouveau poids. Si les animaux contôles et les animaux obèses sont soumis à une restriction alimentaire, ils répondent tous deux par une baisse de poids et un réajustement de leur RMR, conforme à celui calculé par l'équation de Kleiber (Corbett et al., 1986). Ceci montre que ces animaux sont capables de réguler leur métabolisme énergétique de base par rapport à leur nouveau poids.

Le rat Zucker est un des modèles génétiques d'obésité le plus couramment étudié, concernant la question du métabolisme énergétique. Leur obésité se développe par une augmentation de l'apport énergétique couplée à une diminution de la dépense. (Zucker et Zucker, 1961). Chez ces animaux, le RMR est plus faible que celui prévu par l'équation de Kleiber (Keesey et Corbett, 1990), mais reste supérieur à celui des animaux contrôles. Néanmoins, si le rat Zucker obèse est soumis à un régime, il répond par une diminution légère de poids, et son RMR devient comparable à celui des animaux contrôles (Keesey et Corbett, 1990). Le poids total des rats obèses étant double, on imagine aisément le déficit en dépense énergétique de ces animaux. Ces animaux présentent donc une très forte résistance à la perte de poids. Si un mécanisme identique existe chez l'homme, cela pourrait expliquer l'inefficacité des régimes chez certains obèses. En résumé, la dépense d'énergie du rat Zucker obèse est maintenue basse, ce qui favorise le développement et le maintien de l'obésité.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, le RMR est stable pour un individu donné et un poids donné. Les variations du RMR sont dues à la masse hors graisse, au sexe et à l'âge de l'individu (Ravussin et al., 1986) mais également à un déterminant génétique (Bouchard et al, 1989). Il est à noter que le RMR est plus faible chez la femme que chez l'homme, probablement du fait de l'effet des hormones sexuelles sur le métabolisme (Ferraro et al., 1992). Les obèses ont un RMR absolu plus élevé que les non obèses, mais leur RMR relatif est plus faible (Ravussin et al., 1988). Ces données montrent que le RMR est probablement la composante la plus importante de la dépense énergétique. Sa dysrégulation joue probablement un rôle considérable dans le développement de l'obésité.

#### - effet thermique de la nourriture

La thermogénèse fait partie intégrante de la dépense énergétique d'un organisme. Elle se produit principalement dans deux conditions. Tout d'abord, quand l'organisme est soumis à un abaissement de la température extérieure, mais également en période post-prandiale. Le principal organe thermogénique est le tissu adipeux brun. La production de chaleur est obtenu par découplage des respirations mitochondrielles dans ce tissu et fait

intervenir une protéine spécifique de la membrane interne mitochondriale, la protéine découplante UCP (Uncoupling Protein). L'UCP décuple la chaîne respiratoire mitochondriale des phosphorylations oxydatives de l'ADP. Chez les animaux à obésité induite par un régime hyperlipidique, contenant des carbohydrates, la température au niveau de la peau et au niveau rectal augmente, par rapport aux animaux contrôles, montrant que la réponse thermogénique du tissu adipeux brun est fortement accrue (Rothwell et Stock, 1979). La thermogenèse permettrait donc de dissiper une partie de la masse énergétique, en la dépensant sous forme de chaleur. Pittet a été le premier à montrer que chez l'obèse, l'effet thermogénique dû aux carbohydrates était réduit (Pittet et al., 1976), cette diminution de la réponse thermogénique pouvant expliquer partiellement la prise de poids. Chez le rat, l'effet thermique est très variable et dépend de la composition et la saveur du repas et de la prédisposition génétique du sujet à l'obésité. Ces observations effectuées chez l'animal semblent accorder un rôle non négligeable à la thermogenèse dans la pathologie de l'obésité. Cependant, le rôle de ce tissu dans la thermogenèse chez l'homme n'est pas encore déterminé précisément, quoique existant (Rothwell et Stock, 1979). A l'heure actuelle, il est donc difficile de spéculer sur un rôle de la thermogénèse dans le développement de l'obésité humaine.

#### - Activité physique

L'idée d'une baisse de l'activité physique expliquant un développement facilité de l'obésité est une idée attrayante dans la mesure où une baisse de l'activité physique est corrélée avec une prise de poids (Zurlo et al., 1992). Le coût énergétique d'une activité est proportionnel à la masse corporelle, donc supérieur chez les obèses. C'est pourquoi l'obésité est souvent associée avec une activité physique réduite (Chirico et Stunkard, 1960). Ainsi, il est difficile de dire si la diminution de l'activité physique est une cause ou une conséquence de l'obésité.

#### B.2.3. L'apport énergétique

L'apport énergétique est fonction de l'apport alimentaire. Chez l'obèse, la quantité d'énergie apportée est trop grande et ne peut être complètement dépensée. Dans ce cas, comme l'illustre la figure 5, cette énergie sera stockée dans les adipocytes. L'énergie stockée devrait donc correspondre à l'apport d'énergie diminué de la dépense. Cependant, les différentes équations reflétant la balance énergétique ( changement de stockage d'énergie = apport énergétique - dépense; pourcentage d'énergie stockée = pourcentage d'énergie apportée - pourcentage d'énergie dépensée) n'ont pas permis de déterminer de corrélations évidentes entre balance énergétique et prise de poids (Romieu et al., 1988; Alpert, 1990). Il devient donc nécessaire de déterminer l'importance de la

balance de chacun des nutriments afin de trouver des corrélations entre prise de poids et métabolisme énergétique. Pour ce faire, il convient d'étudier une à une la balance de chacun des nutriments et de chercher une corrélation avec le développement de l'obésité :

#### - La balance des protéines

Le pourcentage de protéines stockées correspond au pourcentage de protéines ingérées, diminué du pourcentage de protéines oxydées. La prise de protéines représente environ 15 % de la prise calorique journalière. La partie stockée de cet apport correspond environ à un tiers de la quantité totale de calories stockées (Snyder et al., 1974). La régulation de cette balance est très stricte et un excès d'apport protéique est rapidement métabolisé, sans augmentation significative de la quantité de protéine dans le corps. Le métabolisme protéique ne peut être considéré comme intervenant directement dans l'obésité bien qu'il puisse intervenir indirectement sur la balance des lipides. En effet, l'effet rassasiant des protéines est le plus élevé de tous les nutriments, ce qui provoque une diminution de la prise supplémentaire de nourriture (Blundell et al., 1993).

#### - La balance des carbohydrates

Le pourcentage de carbohydrates stockés correspond au pourcentage de carbohydrates ingérés, diminué du pourcentage de carbohydrates oxydés. Les carbohydrates représentent la principale source de calories. Leur ingestion varie beaucoup selon les jours mais comme pour les protéines, cette balance est très strictement contrôlée (Abbott et al., 1988). Les carbohydrates sont stockés transitoirement sous forme de glycogène, puis rapidement oxydés (Acheson et al., 1988). En cas d'excès d'apport en carbohydrates, ces derniers sont transformés en lipides par lipogenèse de novo. Les enzymes lipogéniques exercent leurs actions au niveau du foie et du tissu adipeux (Zelewski et Swierczynski, 1990; Chascione et al., 1987). Il est nécessaire d'ingérer de grosses quantités de carbohydrates avant de retrouver une conversion en triglycérides (Acheson et al., 1987) et une augmentation de VLDL (Reaven et al., 1965). Cependant, si cette conversion provoque une augmentation des concentrations plasmatiques de triglycérides, elle ne provoque pas de prise significative de poids (Acheson et al., 1988).

#### - La balance lipidique

Au contraire des autres nutriments, le stockage des lipides représente une part importante du stockage énergétique. Cependant, comme pour les protéines, la quantité de lipides ingérés par jour ne représente qu'1 % de la quantité totale stockée, la différence étant que la valeur énergétique de ces 1 % stocké est 6 fois supérieure à la même quantité

de protéines (Bray, 1991). Un changement dans la balance énergétique totale s'explique principalement par un changement dans la balance lipidique (Abbott et al., 1988). L'oxydation des lipides n'est pas régulée par la prise de lipides dans la nourriture, au contraire des autres nutriments (Flatt et al., 1985). Ainsi, en cas de surnutrition, la graisse excédentaire est stockée. Seule la balance énergétique elle-même peut réguler la balance lipidique : si la dépense énergétique est supérieure à l'apport, il y a induction de l'oxydation des graisses stockées (Abbott et al., 1988). La condition *sine qua non* pour qu'il y ait prise de poids est donc un déséquilibre dans la balance lipidique. Pour réduire son poids, il y a donc trois possibilités : augmenter son activité physique, réduire sa prise alimentaire, ces deux possibilités augmentant l'oxydation des lipides, ou enfin réduire sa consommation en lipides. Ceci n'est pas le cas des obèses, qui consomment souvent plus de nourriture et en particulier, plus de lipides et de carbohydrates (Bandini et al., 1990).

L'analyse du métabolisme énergétique permet donc de mettre en évidence que chez l'obèse, la dépense énergétique ne compense pas l'apport énergétique trop important, en particulier en lipides. S'il est important de connaître les mécanismes régissant le métabolisme énergétique, il est tout aussi important d'étudier les mécanismes contrôlant la prise de nourriture.

### B.3. Mécanismes de régulation de la prise de nourriture

Depuis ces dernières années, la recherche a fait d'énormes avancées dans la compréhension des mécanismes régissant la prise de nourriture et le contrôle de l'appétit. Ces découvertes ouvrent de nouvelles voies de recherche pour la thérapie de l'obésité. Les différents niveaux auxquels s'exercent ces régulations sont résumés dans la figure 6 :

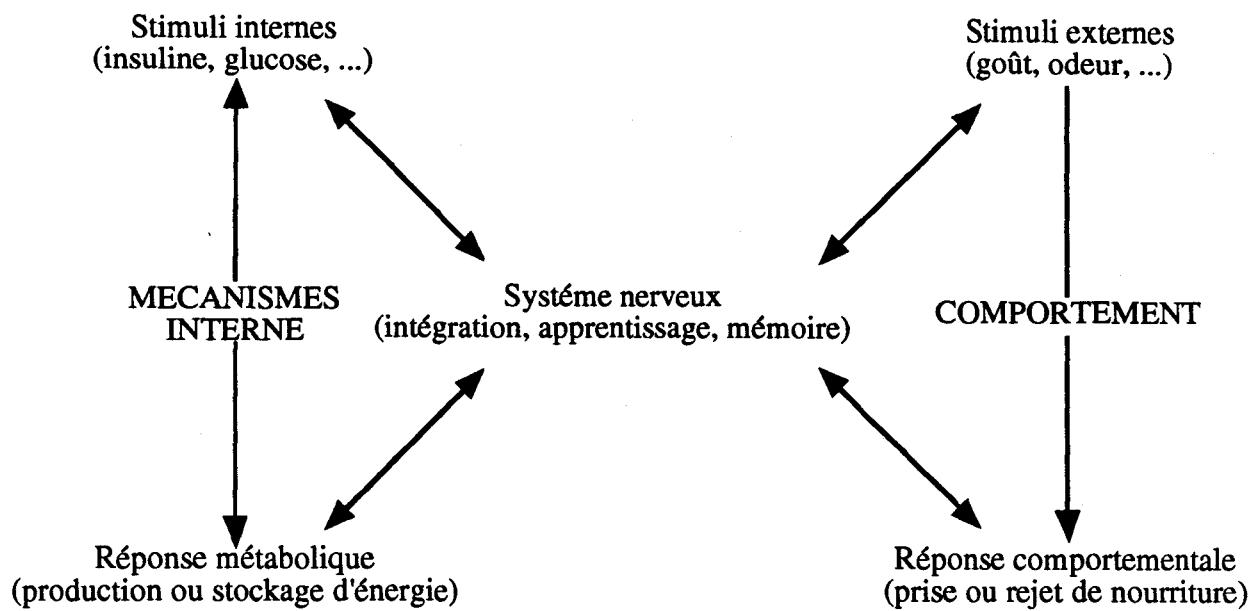


Figure 6 : Représentation schématique de la régulation énergétique.

Dans cette représentation, le système nerveux apparaît au centre de toutes les régulations, intégrant les stimuli externes et internes avant de donner une réponse en retour au niveau du comportement et des mécanismes internes de régulation du métabolisme énergétique. Un dysfonctionnement au niveau du centre nerveux peut être à l'origine du développement de l'obésité, même chez un sujet dont l'alimentation est normale. Ce chapitre se propose d'étudier les différentes voies de régulation afin de chercher celles dont la défectuosité peut expliquer la surcharge pondérale et l'obésité.

### B.3.1. Modèles d'étude

Les animaux présentant une obésité obtenue après intervention chirurgicale ont souvent été utilisés. En particulier, des rats ayant subit une lésion du VMH présentent une surnutrition amenant à l'obésité. Cette lésion affecte probablement la régulation par les stimuli externes et internes, commandant à l'animal l'état de satiété (Figure 6). Ces animaux deviennent hyperphagiques et hyperinsulinémiques. Bray (1985) a montré que lorsque le pancréas est retiré, et qu'un nouveau est greffé dans la capsule rénale, sans innervation de ce nouveau pancréas, l'hyperinsulinémie n'apparaît pas (Bray, 1985). Ces résultats montrent le contrôle nerveux de l'hyperinsulinémie. Par contre, chez les animaux VMH, même si l'on maintient les animaux avec un taux d'insuline constant par perfusion, la lésion du VMH entraîne une hyperphagie (Friedman et al., 1986). Ceci montre que la partie ventromédiane de l'hypothalamus est impliquée dans l'apparition de l'hyperinsulinémie et de l'hyperphagie, mais que ces deux phénomènes ne sont pas régulés par un mécanisme commun.

La lésion du VMH provoque une activité parasympathique accrue et une activité sympathique diminuée chez l'obèse. Powley et Berthoud ont montré qu'une vagotomie peut provoquer un blocage de l'hyperphagie et de l'obésité. Cet effet pourrait résulter d'un blocage de l'activité gastrique précédant les repas qui est un des facteurs provoquant la prise de nourriture (Powley et Berthoud, 1986). Les noyaux paraventriculaires adjacents (PVN) pourraient jouer un rôle fondamental dans le développement de l'hyperphagie, puisque la lésion des PVN, qui provoque l'obésité, provoque l'hyperphagie, mais pas l'hyperinsulinémie (Leibowitz et al., 1992).

Au niveau du foie, les glucorécepteurs sont en liaison avec le cerveau par l'intermédiaire du nerf vague (Powley et Berthoud, 1986). La captation du glucose par ces récepteurs provoque l'état de satiété et intervient probablement dans le contrôle du poids (McGowan et al., 1990). La voie nerveuse n'est probablement pas la seule impliquée dans le contrôle de la satiété au niveau hypothalamique. La découverte récente de deux facteurs protéiques de satiété en est la preuve. Chez la souris la leptine, secrétée par l'adipocyte, qui provoque une diminution de la prise de nourriture (Halaas et al., 1995) et le "Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1)", qui produit le même état de satiété lorsqu'il est injecté chez la souris (Turton et al., 1995), possèdent tous deux des récepteurs au niveau de l'hypothalamus (Tartaglia et al., 1995; Turton et al., 1995). La lésion du VMH pourrait donc faire disparaître cette voie de régulation, expliquant ainsi l'hyperphagie de ces animaux.

Des lésions de la partie latérale de l'hypothalamus (LH) provoquent une réduction de prise de nourriture. L'importance du déficit dépend du degré de dégradation des voies dopaminergiques au niveau du striatum et des noyaux accumbens. Inversement, une suractivité dopaminergique au niveau de ces noyaux est une cause potentielle d'obésité. Une lésion complète de cette zone provoque chez l'animal un arrêt de prise de nourriture (Figure 7) et de boisson pouvant conduire à la mort. Si la lésion est partielle, l'animal pourra se réhabituer à manger à condition que la nourriture soit humide et attrayante (surtout sucrée). Ces animaux se comportent comme des nouveaux-nés apprenant les goûts : le lait est d'abord préféré, ensuite, il laisse sa place à l'eau.

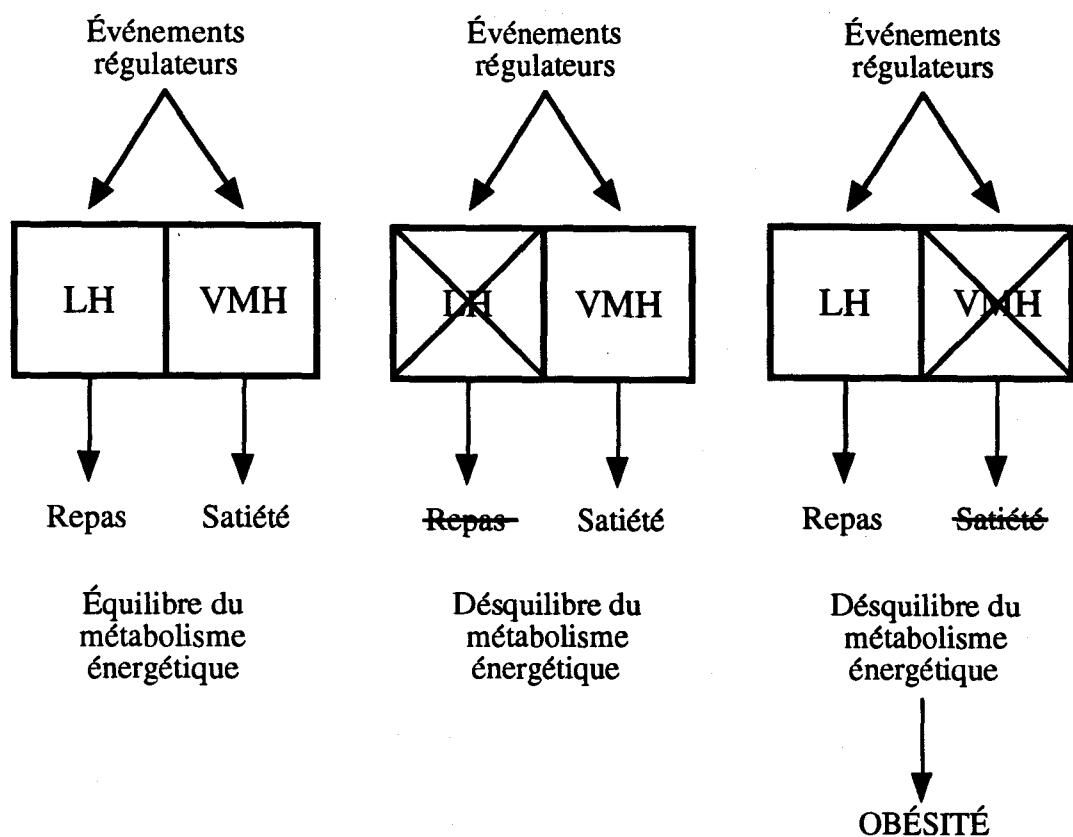


Figure 7 : Rôle des parties ventromédiane et latérale de l'hypothalamus.

L'utilisation de ces deux modèles a donc permis de montrer que la partie ventromédiane de l'hypothalamus (VMH) était impliquée dans l'état de satiété et que la partie latérale de l'hypothalamus (LH) était impliquée dans la prise de nourriture. Ces résultats sont confirmés par stimulation électrique cérébrale. Chez le rat, lorsque la partie médiane de l'hypothalamus est stimulée, cela provoque une baisse de la prise de nourriture chez l'animal. Par contre, une stimulation de la partie latérale provoque une augmentation de la prise de nourriture. Des stimulations répétées de cette zone entraînent une prise de nourriture tellement élevée, que si elle est répétée quotidiennement, l'obésité se développe chez l'animal (Hoebel, 1988). Cette voie serait impliquée dans l'autostimulation qui pousse à prendre un repas. Cette autostimulation est inhibée après le repas, après injection intraveineuse de glucose ou après traitement à la fenfluramine (Hoebel, 1988). Des mesures d'activité cérébrale ont permis de mettre en évidence, chez le gorille, que la vue ou le goût des aliments provoquent des activités importantes au niveau nerveux. Oomura et al. (1991) ont suggéré, en travaillant sur le rat, qu'il existe des populations de neurones glucoréceptives dans le VMH, pouvant jouer un rôle dans la satiété, et d'autres dans le LH, insulino-réceptives, actives uniquement quand l'animal a besoin de se nourrir. (Oomura et al., 1991).

### B.3.2. Régulation de la prise de nourriture

Les mécanismes qui régissent la prise de nourriture ne sont pas encore complètement élucidés de nos jours. Devant la complexité du fonctionnement cérébral et nerveux, cette partie sera traitée de manière non exhaustive.

Des amphétamines injectées au niveau de la partie latérale de l'hypothalamus (LH), inhibent la prise de nourriture par une voie  $\beta$ -adrénergique. Dans ce mécanisme, l'adrénaline est plus active que la noradrénaline (Leibowitz et Myers, 1987). D'autre part, si les voies dopaminergiques sont bloquées au niveau du LH, l'effet inhibiteur de cette dernière sur les noyaux du LH disparaît et une surnutrition accompagnée d'une obésité s'installe (Hoebel et Leibowitz, 1981). Si les animaux sont rendus déficients en adrénaline et noradrénaline, les drogues sérotoninergiques deviennent plus efficaces par action sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques du LH (inhibition de prise de nourriture) ou  $\alpha_1$ -adrénergiques sur le PVN (activation de la satiété) (Leibowitz et Myers, 1987). L'obésité peut donc être le résultat d'un déficit de la réponse aux amphétamines dont les effets sont résumés dans la figure 8 :

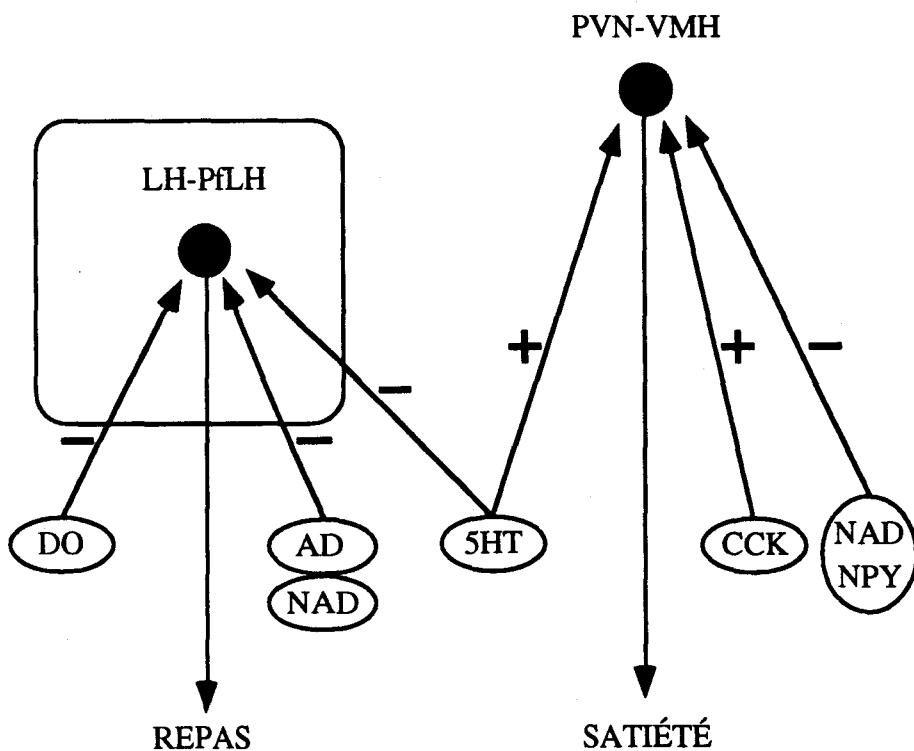


Figure 8 : Contrôle de la prise de nourriture par les neurotransmetteurs.

DO : Dopamine; AD : Adrénaline; NAD : Noradrénaline; 5HT : Sérotonine; CCK : Cholécystokinine; NPY : Neuropeptide Y; LH-PfLH : Hypothalamus latéral et Hypothalamus latéral Périfornical; PVN-VMH : Noyaux Paraventriculaires et Hypothalamus Ventromédian.

Comme nous l'avons vu, la voie des catécholamines (activée par les amphétamines) et celle de la sérotonine agissent à des niveaux différents. Cela se reflète par un effet différent : les catécholamines semblent retarder le début du repas alors que la sérotonine provoque la satiété et donc la fin du repas. Cela est confirmé après administration de fenfluramine, activateur de la voie sérotoninergique, qui provoque un arrêt précoce du repas.

La voie de la sérotonine peut être altérée par la nourriture : un repas riche en carbohydrates provoque une sécrétion accrue d'insuline. Cette augmentation du taux d'insuline va provoquer une augmentation du transport de tryptophane, précurseur de la sérotonine, du sang au cerveau. Cela a pour effet d'augmenter la concentration de sérotonine au niveau du cerveau. Les animaux répondent en mangeant moins de carbohydrates. Le même effet est obtenu si la sérotonine est injectée directement dans le VMH (Leibowitz et Shor-Posner, 1986).

L'administration de phenylpropanolamine (PPA), activateur de la voie noradrénnergique, provoque une satiété, via une activation des récepteurs  $\alpha$ 1-noradrénnergique du PVN (Wellman, 1990). Les récepteurs  $\alpha$ -adrénnergiques du PVN sont activés par la noradrénaline, mais cette dernière joue un rôle différent selon le récepteur sur lequel elle se fixe : ainsi, le récepteur  $\alpha$ 1-adrénnergique induit la satiété alors que le récepteur  $\alpha$ 2-adrénnergique inhibe la satiété. La PPA est donc un agoniste spécifique pour les récepteurs  $\alpha$ 1-adrénnergiques.

Ces activités dépendent également du rythme circadien. Par exemple, chez le rat, l'activité  $\alpha$ 2-adrénnergique due à la noradrénaline est la plus forte au début de la nuit, quand les animaux deviennent actifs et commencent à se nourrir (Leibowitz et Shor-Posner, 1986). Cette activité est directement corrélée au taux de cortisone circulante : le CRF, largué par les PVN, provoque la libération d'ACTH, qui contrôle la production de cortisone. Ce glucocorticoïde potentialise le métabolisme des carbohydrates et en même temps, par régulation en retour, potentialise l'activité  $\alpha$ 2-adrénnergique, et donc l'appétit.

Les récepteurs  $\beta$ -adrénnergiques du LH jouent également un rôle dans ce contrôle de prise de nourriture : des lésions spécifiques sur ces récepteurs provoquent une désinhibition de la prise de nourriture qui peut conduire à l'obésité.

Le Neuropeptide Y (NPY) agit par la même voie que la noradrénaline. A ce jour, le NPY est un des produits connus les plus puissants pour induire la prise de nourriture (Lambert et al., 1993). Si le NPY est injecté à des rats et que le choix de plusieurs aliments est laissé à l'animal, cette injection induit une attirance forte pour les carbohydrates. Par contre, la galanine, un autre neuropeptide, induit la prise préférentielle de graisse (Leibowitz, 1991). Il a été récemment montré, que la leptine, produit du gène *ob*, qui inhibe la prise de nourriture, lorsqu'elle est injectée chez la souris (Halaas et al., 1995), inhibe la synthèse et la sécrétion du NPY (Stephens et al., 1995).

Si certains peptides activent la prise de nourriture, d'autres sont connus pour provoquer la satiété. C'est le cas de trois "peptides de satiété" qui ont également été découverts. Le plus connu est la cholécystokinine (CCK). Ce peptide agit au niveau du tractus gastrointestinal, en provoquant la sensation d'avoir l'estomac plein, ce qui supprime la prise de nourriture. Le même résultat est obtenu après injection directe de ce peptide au niveau du PVN-MH (Hoebel, 1988). Plus récemment, un rôle de facteur de satiété a également été identifié pour le "Glucagon-Like Peptide-1" (GLP-1). Le GLP-1 se fixe au niveau de l'hypothalamus, sur un récepteur qui lui est spécifique, et provoque une inhibition de la prise de nourriture chez le rat, même si ces animaux ont préalablement été mis à jeûne (Turton et al., 1995). Il est intéressant de noter, que le GLP-1 est capable de contrecarrer l'effet inducteur du NPY (Turton et al., 1995).

En résumé, l'équilibre dans le poids de corps, la prise de nourriture et la balance énergétique est régulé au niveau central par différents neurones. Juste avant la prise de repas, le niveau énergétique est très faible. Ce manque d'énergie provoque le déclenchement de signaux, au niveau des organes périphériques, en particulier le foie ou le tissu adipeux qui vont par voies nerveuses (sympathiques), ou hormonales (leptine), activer la cascade de réponses au niveau des différentes zones du cerveau qui induira la prise de nourriture.

L'obésité peut trouver un traitement dans la découverte de molécules agissant au niveau des contrôles des différents événements cités précédemment. L'action pharmacologique pourrait s'exercer à différents niveaux : réduction de la prise totale d'énergie, suppression de la faim ou prolongement de l'état de satiété, réduction de l'attractivité pour certains aliments, accélérer l'arrivée de la satiété (réduire la taille du repas), contrôle de la période séparant les repas, modulation de la sélection des nutriments. Dans le cadre du traitement contre l'obésité, il est indéniable que même si de fortes prédispositions génétiques existent, on ne peut négliger l'importance des facteurs environnementaux dans lesquels la régulation de l'appétit et donc de la balance énergétique intervient.

#### **B.4. Aspect génétique de l'obésité**

##### **B.4.1. Génétique et obésité humaine**

L'obésité humaine représente le plus souvent un désordre familial, ce qui implique l'intervention de facteurs génétiques dans cette maladie. L'obésité est le résultat d'un désordre environnemental et comportemental, que nous avons traité dans les chapitres précédents et d'un désordre génétique que nous allons maintenant aborder. Trois types d'études sont couramment employés au niveau épidémiologique : les études de famille,

les études sur les adoptés et les études sur les jumeaux. Les études de famille montrent qu'il y a le plus souvent transmission familiale de l'obésité, mais que cette transmission n'est pas toujours attribuée complètement au facteur génétique. En outre, lorsque l'obésité est associée à un problème génétique, ces études montrent qu'il doit exister plusieurs gènes impliqués dans cette maladie. Les études effectuées sur des personnes adoptées ont montré que ces personnes développent un BMI proche de leurs parents biologiques et non pas adoptifs. Dans ce contexte les facteurs environnementaux et comportementaux semblent avoir un rôle plus ou moins important dans le développement de l'obésité chez l'adulte (Sorensen et al., 1992). Les études effectuées sur les jumeaux permettent d'apprécier plus précisément l'influence des facteurs génétiques sur le développement de l'obésité, en comparant des jumeaux monozygotes et dizygotes qui évoluent dans le même environnement. A la vue de ces études, il faut retenir qu'il existe plusieurs gènes impliqués dans le développement de l'obésité et que la transmission génétique ne se fait que si l'ensemble des facteurs génétiques est transmis.

A ce jour, à peu près 20 régions chromosomiques qui pourraient jouer un rôle dans certaines caractéristiques associées à l'obésité ont été identifiées (pour revue, Bouchard, 1995). Par exemple, un polymorphisme dans le gène de l'UCP, impliqué dans la thermogénèse par le tissu adipeux brun est associé avec un gain de graisse au cours des années (Oppert et al., 1994). Un autre exemple consiste dans le polymorphisme du gène de l' $\alpha$ -2 adrenorécepteur au niveau périphérique, associé avec une augmentation de la graisse supérieure chez la femme (Oppert et al., 1995). Cependant, les bases moléculaires de ces variations dans des séquences d'ADN, ainsi que les conséquences physiologiques, ne sont pas encore connues.

Trois études récentes, qui avaient pour but de rechercher des variations génétiques dans le gène du récepteur  $\beta$ -3 adrénergique, ont amené à la découverte d'une mutation, associée à la capacité de prendre du poids et au développement précoce du diabète non-insulino dépendant (NIDDM) dans trois populations différentes de sujets obéses (Watson et al., 1995; Widen et al., 1995; Clément et al., 1995). La mutation substitue un tryptophane en position 64 en arginine, au début de la première boucle intracellulaire du récepteur. Par étude d'homologie avec d'autres récepteurs membranaires, il est probable que cette mutation provoque une expression défective du récepteur à la surface membranaire et une incapacité de transmettre le signal. Ainsi, les conséquences fonctionnelles de cette mutation pourraient impliquer une diminution de l'activité lipolytique dans le tissu adipeux viscéral, à l'endroit même où ce récepteur exercerait son activité lipolytique. Cette situation pourrait donc aggraver l'obésité.

L'identification des gènes impliqués dans l'obésité dans des modèles animaux pourrait révéler l'existence de nouveaux gènes candidats de l'obésité. En effet, plusieurs modèles animaux d'obésité ont été décrits chez la souris, un modèle excellent pour l'analyse génétique, du fait de la facilité d'élevage des lignées naturelles.

#### B.4.2. Modèles animaux d'obésité

Les modèles polygéniques d'animaux comprennent les souris NZO (New Zealand Obese), les souris KK japonaises, les souris Wellesley et les souris récemment décrites BSB (Fisler et al., 1993) et AKR/J (West et al., 1994a). Par approche statistique, quatre différents loci associés à la graisse corporelle ont été identifiés dans les souris BSB (Warden et al., 1995). Dans les souris ARK/J, très sensibles à l'obésité, cette approche a permis l'isolation de trois loci associés à ce trait (West et al., 1994a; West et al., 1994b). À notre connaissance, aucun des gènes murins n'a été identifié, mais dans le futur proche, il est certain que cette approche permettra d'apporter des résultats intéressants.

Par contre, l'analyse génétique des modèles monogéniques d'animaux obéses (Table 3) a pour l'instant été plus productive, permettant la découverte de trois gènes : *agouti*, *ob* et *fat*, comme déterminant majeur de l'obésité. Ces progrès significatifs ont été obtenus en utilisant les techniques de clonage directionnel, grâce au phénotype bien caractérisé des mutants. Les gènes *agouti* et *ob* étaient totalement inconnus, alors que le gène *fat* est le gène codant pour la carboxypeptidase E. Trois autres mutations simples (*ad*, *tub* et *db*) ont été identifiées chez des animaux de phénotype obèse. La caractérisation des gènes correspondant est actuellement en cours. Chez le rat, la mutation *fa* résulte également en une obésité massive et correspond à une région correspondant au locus *db* chez la souris (Truett et al., 1991). Ceci suggère que *db* et *fa* sont des mutations dans des gènes homologues. Une mutation identique chez l'homme est donc envisageable.

Le nombre de modèles animaux "obèse" montrant des caractéristiques génétiques différentes, confirme que plusieurs mutations peuvent induire l'obésité. De plus, les caractéristiques physiologiques du syndrôme obèse varient selon la mutation. Par exemple, *tub* et *fat* provoquent un développement lent de l'obésité avec de légères altérations dans le métabolisme glucidique; au contraire, les mutations *db* et *ob* résultent dans un développement précoce associé au NIDDM (Coleman, 1978; Coleman et Eicher, 1990). Ainsi, chaque mutation pourrait affecter des mécanismes spécifiques. C'est pourquoi l'identification des gènes impliqués pourra amener à une meilleure compréhension des systèmes physiologiques contrôlant le poids corporel.

Espèces	Nom	Allèle	Transmission	Chromosome souris rat	Région homologue chez l'homme
Souris	Yellow	<i>A<sup>y</sup></i> <i>A<sup>vy</sup></i>	Dominante	2	20q11-2
	Adipose	<i>Ad</i>	Dominante	7	-
	Obese	<i>ob</i>	Récéssive	6	7q31-32
	Diabétique	<i>db</i> <i>db<sup>2f</sup></i> <i>db<sup>3j</sup></i> <i>db<sup>ad</sup></i> <i>db<sup>pas</sup></i>	Récéssive	4	1p31-34
	Fat	<i>fat</i>	Récéssive	8	16q22-24
	Tubby	<i>tub</i>	Récéssive	7	11p15-1
Rat	Fatty	<i>fa</i>	Récéssive	5	1p31-34

Table 3 : Les obésités génétiques monogéniques

#### B.4.2.1. La mutation *fat*

La mutation *fat* a été identifiée sur le chromosome 8 à proximité de la région du gène CPE (carboxypeptidase E). Dans ce cas, une simple mutation d'une base, résultant dans la substitution d'une sérine en position 202 en proline a été identifiée chez la souris *fat/fat* (Paigen et Coleman, 1990). Cette mutation est associée à une perte de l'activité carboxypeptidase, probablement due à une instabilité de la protéine du fait de la mutation. La CPE, normalement présente dans les granules secrétés par le pancréas, excise les résidus d'acides aminés dibasiques restant sur la partie C-terminale des prohormones, incluant l'insuline. Associée avec la perte de l'activité CPE, l'hyperproinsulinémie est la première caractéristique phénotypique causée par la mutation *fat* (Naggert et al., 1995). Cependant, la relation entre ce défaut et l'apparition tardive de l'obésité reste imprécise. Il a été proposé que des problèmes supplémentaires dans la maturation des neuropeptides associés à la dépense énergétique, la répartition de la nourriture et la faim pourraient ainsi favoriser le développement de l'obésité chez ces animaux (Naggert et al., 1995). Chez l'homme, l'hyperinsulinémie observée chez certains obèses pourrait résulter d'un problème identique, lié à la maturation de la proinsuline par des enzymes de conversion. Néanmoins, de tels résultats n'ont, à l'heure actuelle, pas encore été montrés.

#### B.4.2.2. La mutation *agouti*

Les analyses génétiques du locus de la souris *agouti* sont en cours depuis presqu'un siècle compte tenu de son rôle dans la régulation de la couleur du pelage. Ces études ont permis d'identifier plusieurs mutations récessives et dominantes sur ce locus. Deux mutations dominantes *A<sup>y</sup>* et *A<sup>vy</sup>* (Table X) sont associées avec le développement de l'obésité dans les souris appelées "mutants jaunes obèses". Le gène *agouti* murin a été identifié indépendamment par deux groupes en 1992 (Butltman et al., 1992; Miller et al., 1993). Chez les souris sauvages, les transcripts de l'ARNm *agouti* sont exprimés exclusivement dans la peau des souris néonatales. Au contraire, l'ARNm *agouti* est exprimé dans tous les tissus chez la souris jaune adulte (Butltman et al., 1992; Miller et al., 1993). Plus récemment, il a été montré que la mutation *A<sup>y</sup>* résulte en la délétion de 170 Kb, ce qui met la partie codante du gène sous le contrôle d'un autre gène appelé *Raly* (Michaud et al., 1994). Des expériences récentes utilisant des souris transgéniques exprimant l'ADNc *agouti*, sous contrôle du promoteur de la β-actine humaine, confirment l'expression ubiquitaire de cette protéine provoquant le phénotype obèse jaune (Perry et al., 1995; Kleibig et al., 1995). D'autres expériences sur les animaux transgéniques avec des promoteurs tissus-spécifiques pourront aider à déterminer si l'expression ubiquitaire de la protéine est nécessaire à l'effet ou non. Bien que les défauts génétiques impliqués dans la mutation *A<sup>y</sup>* commencent à être décryptés, il reste à déterminer le mécanisme par lequel cette expression anormale du gène *agouti* intervient dans le développement de l'obésité.

La protéine *agouti* est une petite protéine (131 aa), contenant un peptide signal consensus N-terminal. La délétion de cette séquence résulte en une perte de fonction, indiquant que la protéine doit être secrétée pour être active (Perry et al., 1995). Il a été proposé que le produit du gène *agouti* agit comme un facteur paracrine. La séquence d'acides aminés du gène *agouti* ne présente aucune homologie avec aucune autre protéine connue exceptée celles d'une classe des toxines produites chez les invertébrés (Manne et al., 1995). Ces toxines sont connues pour interagir avec des récepteurs de neurotransmetteurs et des canaux ioniques suggérant que la protéine *agouti* pourrait avoir un mécanisme d'action similaire. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que l'*agouti* est capable d'induire une augmentation du calcium intracellulaire libre dans des myocytes de muscle squelettique (Zemel et al., 1995). Bien que le mécanisme d'action de l'*agouti* ne soit pas encore connu, la démonstration du rôle de cette protéine dans les modifications de concentration de calcium intracellulaire joue en faveur d'un rôle important dans plusieurs fonctions cellulaires. D'autres mécanismes d'action de l'*agouti* viennent de l'étude des mécanismes impliqués dans la régulation de la couleur. Normalement, la fixation de l'hormone stimulante des α-mélanocytes (α-MSH) à son récepteur (MC1-R) déclenche un phénomène de transduction de signal impliquant

l'activation d'une adenylylate cyclase et une élévation de l'AMPc, résultant finalement à la synthèse du pigment noir, l'eumélanine. Par inhibition compétitive avec l' $\alpha$ -MSH pour le MC1-R, la protéine *agouti* empêche l'augmentation de l'AMPc, permettant l'apparition de la couleur jaune (phaemélanine) (Lu et al., 1994). De manière intéressante, l'*agouti* est aussi un antagoniste d'un récepteur apparenté, MC4-R, exprimé dans le cerveau (Lu et al., 1994). Bien que les conséquences physiologiques de cette dernière observation restent peu claires, elles indiquent que l'*agouti* pourrait agir sur les tissus ou les cellules autres que les mélanocytes à condition qu'elles expriment le récepteur approprié.

Le clonage récent du gène humain de l'*agouti* révèle que ce gène s'exprime dans divers organes et tissus, incluant le tissu adipeux (Wilson et al., 1995; Kwon et al., 1994). Il est tentant de spéculer sur le fait que l'*agouti* pourrait avoir un effet direct sur les cellules adipeuses. Une synthèse ou une sécrétion accrue d'*agouti* pourrait induire une diminution des taux d'AMPc, amenant une diminution de la lipolyse, et favorisant le stockage de graisses. Alternativement ou en même temps, en augmentant les concentrations de calcium, l'*agouti* a le potentiel d'altérer la voie de plusieurs hormones comme l'insuline. De tels mécanismes sont encore à démontrer mais pourraient être impliqués dans le développement de l'obésité chez l'humain, si des niveaux anormaux d'*agouti* sont exprimés dans les cellules adipeuses.

#### B.4.2.3. La mutation *ob*

Le gène *ob* a été cloné en 1994 chez l'homme et la souris par l'équipe de Friedman (Zhang et al., 1994). Depuis, la structure de ce gène a été identifiée chez l'homme (Isse et al., 1995, Geffroy et al., 1995) et chez la souris (He et al., 1995). Par la suite, d'autres groupes ont identifié le même gène chez le rat. Il présente une forte homologie avec le gène humain et murin (Murakami et Shima, 1995; Ogawa et al., 1995). Deux mutations dans le gène *ob* ont été découvertes chez la souris, la première dans la lignée C57BL/6J *ob/ob* et la seconde dans la lignée SM/Ckc<sup>-</sup>+Dac *ob<sup>2j</sup>/ob<sup>2j</sup>*, les deux mutants présentant le même phénotype. Dans la lignée originale, la mutation d'une seule base dans le codon 105 substitue une arginine en codon stop, ce qui provoque l'absence de protéine *ob* fonctionnelle. La surexpression de l'ARNm de l'*ob* dans ces souris suggère l'existence d'une boucle de régulation contrôlant l'expression du gène *ob*. Cette mutation n'a pas été identifiée chez l'homme, dans une population limitée de sujets normaux et obèses (Considine et al., 1995). La base moléculaire de la mutation *ob<sup>2j</sup>* n'est pas connue, cependant l'absence des transcript *ob* suggère une altération du promoteur du gène *ob* dans cette lignée.

L'ARNm de l'*ob* a d'abord été trouvé comme étant exprimé uniquement dans la graisse blanche. Des observations plus récentes ont montré une expression, plus faible, dans la graisse brune chez les rongeurs, mais pas dans les autres tissus testés (Ogawa et

al., 1995; Frederich et al., 1995). Le gène de l'*ob* code pour une petite protéine de 167 acides aminés, qui n'a aucune ressemblance avec toutes autres protéines secrétées déjà connues. La mise au point récente d'anticorps spécifiques a confirmé la présence de la protéine dans le plasma des souris normales et l'absence chez les souris mutantes *ob* (Halaas et al., 1995). Ceci suggère que l'absence du produit du gène *ob* provoque l'obésité. De plus, l'effet amaigrissant de la protéine *ob* a été clairement décrit par cinq groupes différents, qui ont montré que l'injection de la protéine recombinante provoque une diminution du poids corporel chez les sauvages et les souris mutantes obèses C57BL/6J *ob/ob* (Halaas et al., 1995; Campfield et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995; Weigle et al., 1995; Rentsch et al., 1995). Cette protéine est actuellement appelée leptine, ce qui provient du grec leptos qui signifie mince (Halaas et al., 1995).

Le mécanisme par lequel cette nouvelle hormone régule le poids corporel n'est pas encore complètement élucidé. Dans les années 80, les expériences de Coleman avaient permis de suspecter un rôle de facteur de satiété pour la leptine. En effet, quand les souris *ob/ob* étaient croisées avec des souris normales, elles réduisaient leur prise de nourriture et leur poids corporel, suggérant qu'elles répondaient à un facteur sanguin de satiété produit par les souris normales (Coleman, 1978). La découverte de la leptine a permis de montrer que cette hormone, outre son action sur l'appétit, augmentait la dépense d'énergie (Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al.). Cette double action de la leptine et son expression tissu-spécifique au niveau du tissu adipeux colle avec le concept de facteur de satiété dérivant du tissu adipeux, apporté après les résultats de nombreux travaux sur le contrôle du poids corporel (pour revue Rink, 1994). Ce facteur, la leptine, était supposé moduler le stockage des lipides, commandé par le cerveau, pour permettre la réponse appropriée, tant dans la prise de nourriture, que dans la dépense d'énergie pour maintenir le poids corporel. De nouveaux éléments de réponse, quant au fonctionnement de la leptine, ont été récemment apportés par la découverte du récepteur à la leptine (Tartaglia et al., 1995). Ces auteurs ont identifié un récepteur à la leptine au niveau du plexus choroïde, nommé OB-R. OB-R est une protéine de 816 a.a, dont 34 cytoplasmiques et présente des caractéristiques de récepteur de cytokine, qui le rapproche de la chaîne gp130 du récepteur de l'interleukine 6, du récepteur du LIF (Leukemia Inhibitory Factor) et du G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) (Tartaglia et al., 1995). Ce récepteur est exprimé principalement dans le poumon et le rein et se trouve, en quantité plus réduite dans d'autres tissus, en particulier dans l'hypothalamus. La présence d'OB-R dans l'hypothalamus relève d'une importance non négligeable, puisqu'il a été récemment montré que la leptine, injectée au niveau du cerveau chez la souris, inhibait la synthèse et la sécrétion du NPY, un des plus puissants activateurs de prise de nourriture connu à ce jour (Stephens et al., 1995). A la vue de ces données, le mode d'action de la leptine pourrait être celui représenté figure 9.

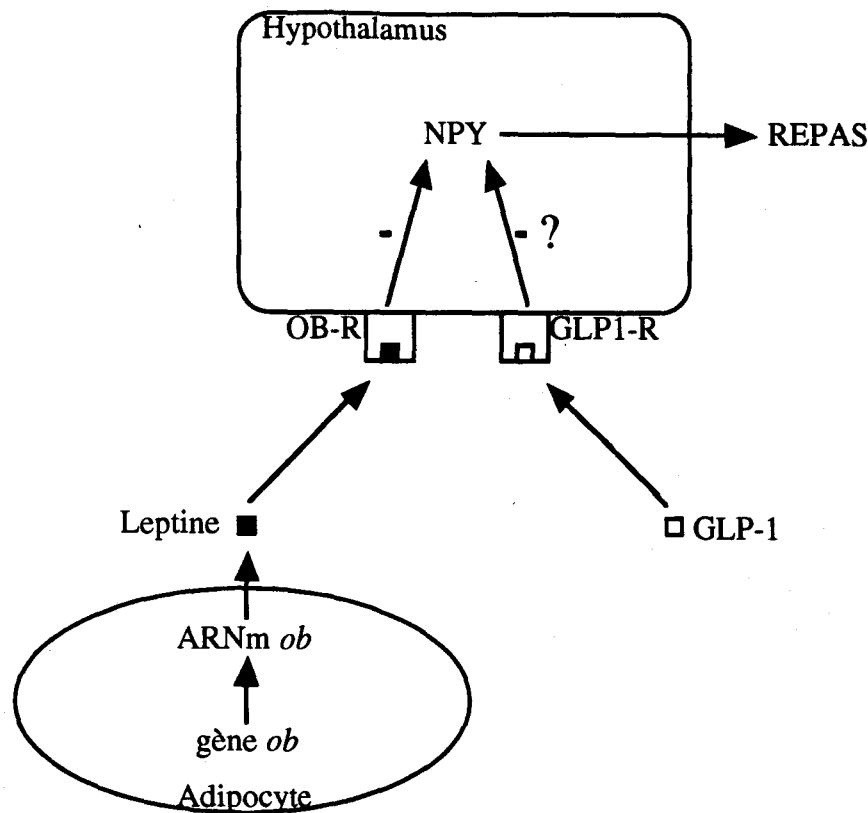


Figure 9 : Mode d'action hypothétique de la leptine

Dans le même ordre d'idée, une surexpression du gène *ob* est observée dans plusieurs modèles d'animaux obèses qui sont hyperphagiques et hyperinsulinémiques, comme les souris *db/db*, les rats Zucker *fa/fa* ou les rats VMH (Murakami et Shima, 1995a; Ogawa et al., 1995; Halaas et al., 1995; Maffei et al., 1995). Cela suggère que ces animaux sont résistants ou ne répondent pas aux effets de la leptine. Cette hypothèse est confirmée par le fait que les souris *db/db* sont résistantes à l'injection de la leptine, ne répondant pas par une baisse de prise de nourriture (Halaas et al., 1995; Campfield et al., 1995). Il est intéressant de noter que OB-R est situé sur le même locus que *db* (Tartaglia et al., 1995). Cela suggère que *db* pourrait coder pour le récepteur à la leptine. Pour les rats VMH, il apparaît évident qu'en absence du récepteur à la leptine, cette dernière ne pourrait plus se fixer sur son récepteur, qui serait situé sur le VMH et l'effet de la leptine ne pourrait plus être transduit.

L'importance de la leptine dans l'obésité humaine reste à déterminer. Pour l'instant, nous savons que l'ARNm *ob* est exprimé dans plusieurs dépôts graisseux (Considine et al., 1995; Masuzaki et al., 1995; Lonnqvist et al., 1995; Hamilton et al., 1995). Aucune évidence n'existe concernant le manque de la leptine chez certains sujets obèses, ni sur des variations génétiques dans le gène *ob* associées avec le NIDDM ou encore dans l'obésité sur la population mexicano-américaines (Stirling et al., 1995). De manière surprenante, il y a une forte corrélation positive entre le BMI et les taux d'ARNm de l'*ob*

dans les tissus adipeux sous cutanés abdominaux et omentaux (Considine et al., 1995; Hamilton et al., 1995). Ces observations supportent l'hypothèse que l'expression de la leptine pourrait refléter la taille des cellules adipeuses (Hamilton et al., 1995). Récemment, il a été montré que chez certains obèses, la leptine existe en concentrations plus hautes chez l'obèse par rapport aux non obèses, ce qui confirme l'hypothèse. Cependant l'explication de ce phénomène demeure inconnu (Considine et al., 1996). Ceci implique une sorte de résistance à la leptine chez les sujets obèses. Après la masse énorme d'informations accumulées sur le gène *ob* chez les rongeurs, il reste à montrer l'importance de la leptine dans l'obésité humaine. Il restera seulement à déterminer si l'administration de leptine chez l'homme pourra contrecarrer le syndrome potentiel de résistance à la leptine chez les sujets obèses.

# RESULTATS ET DISCUSSION

## A. RÉGULATION DU GÈNE DE L'APOLIPOPROTÉINE A-I

### A.1. Régulation du gène de l'apolipoprotéine A-I par les glucocorticoïdes

#### A.1.1. Introduction

Chez l'homme, un traitement aux glucocorticoïdes, agents anti-inflammatoires couramment utilisés, provoque deux effets majeurs sur le métabolisme lipidique. Le premier effet consiste en une augmentation des taux plasmatiques des triglycérides, des VLDL et des LDL (Zimmerman et al., 1984; Ettinger et al., 1987), ce qui représente un effet plutôt néfaste dans le cadre de l'athérosclérose. Le même traitement aux glucocorticoïdes provoque une augmentation des taux de HDL (Mitamura, 1987), ce qui représente un effet plutôt bénéfique, puisque les taux de HDL sont inversement corrélés au risque de développement de l'athérosclérose. Néanmoins, malgré cet effet bénéfique sur les taux de HDL, un traitement avec des glucocorticoïdes semble plutôt prédisposer au développement de l'athérosclérose (Nashel, 1986).

Chez le rat, l'effet des corticostéroïdes sur les lipoprotéines plasmatiques dépend du type de molécule. L'administration d'hydrocortisone, corticostéroïde naturel, possédant un effet minéralo- et glucocorticoïde, provoque une baisse du cholestérol total et n'a pas d'effet sur les triglycérides chez le rat (Staels et al., 1991). Par contre, les corticostéroïdes synthétiques, comme la dexaméthasone ou la triamcinolone, qui possèdent majoritairement un effet glucocorticoïde, provoquent généralement chez le rat une augmentation des taux plasmatiques de VLDL et de triglycérides, mais cet effet peut être variable selon le corticostéroïde employé. Par contre, tous les corticostéroïdes synthétiques provoquent une augmentation des taux plasmatiques de HDL (Bartlett et Gibbons, 1988; Jansen et al., 1992).

Les apolipoprotéines A-I et A-II sont les principaux constituants protéiques des lipoprotéines de hautes densités (HDL), qui sont impliquées dans le transport inverse du cholestérol. Chez le rat, l'augmentation des taux plasmatiques de HDL observée après traitement aux glucocorticoïdes de synthèse, s'accompagne toujours d'une augmentation des concentrations plasmatiques en apo A-I (Staels et al., 1991). La dexaméthasone a l'effet inducteur le plus prononcé (Staels et al., 1991).

Les glucocorticoïdes exercent leur action en activant un récepteur nucléaire qui leur est spécifique, le récepteur aux glucocorticoïdes (GR). Ce récepteur activé va moduler la transcription du gène cible, en se fixant sur un élément de réponse qui lui est spécifique, le GRE (Glucocorticoid Responsive Element), situé sur le promoteur du gène cible. Il est

donc probable que l'effet inducteur sur les concentrations plasmatiques d'apo A-I soit en partie dû, à un effet sur l'expression du gène de cette apolipoprotéine. C'est pourquoi, nous avons choisi d'étudier le mécanisme d'action de la dexaméthasone sur l'expression du gène de l'apolipoprotéine A-I.

#### A.1.2. Résultats et discussion

L'administration de dexaméthasone chez le rat, provoque, outre l'augmentation des concentrations plasmatiques d'apo A-I, une augmentation des taux hépatiques d'ARNm, mais pas intestinaux, d'apo A-I (Staels et al., 1991). Dans le même temps, les taux d'ARNm de l'apo A-II sont diminués (Staels et al., 1991).

Chez le rat, nous avons montré une augmentation des taux d'ARNm de l'apo A-I 6 heures après le traitement avec la dexaméthasone. Dans le même temps, l'effet sur l'apo A-II est déjà visible. La rapidité de la réponse semble indiquer une régulation directe du gène de l'apo A-I par les glucocorticoïdes. Afin d'étudier plus précisément l'effet de la dexaméthasone sur l'expression du gène de l'apo A-I, nous avons utilisé deux lignées cellulaires, les cultures primaires d'hépatocytes de rat et une lignée transformée d'hépatomes de rat, les McARH8994. Ces deux lignées expriment les apolipoprotéines A-I, A-II et E, cette dernière n'étant pas régulée par les corticostéroïdes et donc utilisée comme contrôle dans cette étude (Staels et al., 1991).

Sur les deux lignées, nous avons montré une induction dose- et temps- dépendante de l'expression du gène de l'apo A-I après traitement à la dexaméthasone. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment sur cultures primaires d'hépatocytes (Masumoto et al., 1988; Lin, 1988). Cet effet est dû à l'effet glucocorticoïde, car l'aldostérone, un minéralocorticoïde n'a pas d'effet. Ceci est confirmé par l'utilisation du RU486, un inhibiteur compétitif des glucocorticoïdes pour le GR, qui bloque l'effet inducteur de la dexaméthasone sur les taux d'ARNm de l'apo A-I.

Afin de déterminer si cet effet était transcriptionnel, nous avons utilisé deux approches : une approche indirecte, en utilisant l'actinomycine D, qui est un inhibiteur de transcription, et une approche directe, en utilisant la technique de nuclear run-on, qui permet de mesurer le taux de transcription d'un gène donné. Nos résultats montrent que l'ajout simultané de dexaméthasone et d'actinomycine D bloque l'effet activateur sur l'apo A-I. Le nuclear run-on nous a permis de confirmer cet effet de la dexaméthasone sur la transcription du gène de l'apo A-I dans les McARH8994 et les hépatocytes primaires. Afin de caractériser les mécanismes moléculaires de cette régulation, nous avons cloné le promoteur de l'apo A-I de rat en amont d'un gène rapporteur Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT). Par transfection transitoire dans les cellules McARH8994, nous avons montré que la partie couvrant les nucléotides en position -252 jusqu'à la position +15 du promoteur de l'apo A-I placée en amont du gène rapporteur CAT, est suffisante

pour mettre en évidence l'effet activateur de la dexaméthasone sur la transcription du gène de l'apo A-I. Cette activation fait intervenir le GR car l'utilisation simultanée de RU486 abolit cette activation dans les cellules McARH8994. Par contre, l'effet de la dexaméthasone sur le promoteur du gène de l'apo A-I, n'est pas reproduit dans les cellules non hépatiques, même en présence d'un vecteur d'expression du GR. Ceci implique qu'un facteur spécifique du foie, autre que le GR, doit être présent pour permettre à la dexaméthasone d'activer l'expression du gène de l'apo A-I. Ce facteur doit être néo-synthétisé car l'utilisation de la cyclohéximide, inhibiteur de traduction, abolit l'effet de la dexaméthasone. A l'issue de ces observations, trois hypothèses peuvent être formulées, concernant le mécanisme :

Tout d'abord, un mécanisme indirect pourrait être invoqué. Les glucocorticoïdes pourraient activer l'expression du gène d'un facteur de transcription intermédiaire, à effet activateur sur l'expression du gène de l'apo A-I. Ceci implique que ce facteur devrait porter dans le promoteur de son gène un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE).

Ensuite, ce facteur pourrait être un facteur de transcription coopérant avec le GR pour produire l'effet sur le promoteur du gène de l'apo A-I. Un mécanisme similaire a été décrit dans le cas du promoteur du gène TAT où un cis-élément nommé GME (Glucocorticoid Modulatory Element) intervient dans la réponse aux glucocorticoïdes (Oshima et al., 1992). Ce site fixe deux facteurs récemment identifiés, GMEB1 et 2 (Oshima et al., 1995), et potentialise la réponse aux glucocorticoïdes à des doses physiologiques en interagissant avec deux sites GRE situés sur le promoteur du gène TAT.

Enfin, le facteur intermédiaire pourrait être un co-facteur nécessaire à l'activité des glucocorticoïdes sur le promoteur de l'apo A-I (Jacq et al., 1994). Ces co-facteurs permettent le "pontage" entre le GR fixé sur son site, et la machinerie transcriptionnelle de base, résultant dans l'effet sur la transcription. Récemment, de telles protéines ont été isolées, comme ERAP 160 (Estrogen receptor associated protein) dans le cas du récepteur aux oestrogènes (Halachmi et al., 1994) ou encore Trip1 dans le cas du récepteur aux hormones thyroïdiennes (Lee et al., 1995). Ces protéines ont une demi-vie très courte, ce qui est compatible avec la rapidité de l'effet observé dans le cas de la dexaméthasone et l'apo A-I

Alors que les deux dernières hypothèses suggèrent la présence d'un GRE fonctionnel dans le promoteur du gène de l'apo A-I, la première hypothèse ne semble pas nécessiter la présence d'un GRE dans le promoteur de l'apo A-I

Les glucocorticoïdes augmentent les concentrations plasmatiques de HDL, ce qui est corrélé avec une augmentation des concentrations plasmatiques en apo A-I. Nos résultats montrent que cette augmentation pourrait résulter d'une augmentation de l'expression du gène de l'apo A-I. Étant donné le rôle protecteur des HDL dans le développement de l'athérosclérose, comprendre le mécanisme par lequel les

glucocorticoïdes régulent l'expression du gène de l'apo A-I pourrait permettre la mise au point de corticostéroïdes synthétiques, ayant l'effet spécifique souhaité, c'est-à-dire l'augmentation des concentrations plasmatiques des HDL, sans effet sur les taux de VLDL ou de LDL. Le fait que certains glucocorticoïdes, comme la triamcinolone, aient un effet sélectif sur la concentration des HDL, sans changer les triglycérides chez le rat (Jansen et al., 1992) témoigne de la faisabilité de cette approche. Néanmoins, il restera à déterminer si de tels résultats pourront être obtenus chez l'homme.

#### **A.2. Régulation du gène de l'apolipoprotéine A-I par les fibrates et les acides gras**

Les acides gras alimentaires représentent une des principales sources d'énergie pour l'organisme. Outre cet effet, les acides gras, tout comme les hormones ou les médicaments, peuvent également agir comme molécules régulatrices (Gottlicher et al., 1992). En particulier, les acides gras exogènes, apportés par l'alimentation, tout comme les acides gras endogènes, peuvent réguler le métabolisme lipidique.

Chez l'homme, le changement d'un régime riche en carbohydrates, vers un régime riche en acides gras, a pour conséquence une augmentation des concentrations plasmatiques des HDL (Grundy et al., 1988). Néanmoins, les différents acides gras ont des effets plus ou moins prononcés sur cette augmentation. Ainsi, les acides gras saturés sont plus efficaces que les acides gras monoinsaturés, eux-même plus efficaces que les acides gras polyinsaturés dans leurs effets inducteurs sur les taux plasmatiques de HDL, lorsqu'ils se substituent aux carbohydrates (Katan et al., 1994). Par ailleurs, lorsque les acides gras saturés sont remplacés par des acides gras monoinsaturés ou polyinsaturés, qu'ils soient de la famille n-3 ou n-6, une baisse des concentrations plasmatiques de HDL est observée (Katan et al., 1994; Weintraub et al., 1988; Grundy, 1994). La réduction des taux la plus forte est obtenue avec les acides gras polyinsaturés n-3.

Le mécanisme par lesquels les acides gras régulent les concentrations plasmatiques des HDL, pourrait faire intervenir une régulation sur les gènes codant pour les apolipoprotéines constitutives des HDL, principalement les apo A-I et A-II. Ceci pourrait être le cas, puisque Stucchi et al. (1991), ont montré chez les primates, que l'augmentation plasmatique des HDL était corrélée avec une augmentation de la synthèse et la sécrétion d'apo A-I, lorsque les acides gras saturés sont substitués aux carbohydrates dans l'alimentation. Dans la même espèce, lorsque ce régime est lui-même substitué à un régime riche en acides gras polyinsaturés, la baisse des concentrations plasmatiques de HDL s'accompagne d'une baisse de synthèse et de sécrétion de l'apo A-I (Brousseau et al., 1995).

Chez le rat, la substitution d'un régime riche en carbohydrates, par un régime riche en acides gras saturés, provoque le même effet activateur sur les concentrations

plasmatiques de HDL (Ribeiro et al., 1992). De la même manière, lorsque le régime riche en acides gras saturés est remplacé par un régime riche en acides gras polyinsaturés, une baisse des concentrations plasmatiques des HDL est observée. Ces observations font du rat un bon modèle d'étude pour l'effet des acides gras sur le métabolisme des HDL.

L'hypothèse de notre travail était de voir si cet effet, tout comme chez l'homme, se traduisait par une modification de l'expression des gènes codant pour les apolipoprotéines.

Nous avons montré que chez le rat, l'apport d'acides gras saturés en remplacement d'un régime riche en carbohydrates, provoque une augmentation des taux d'ARNm de l'apo A-I. Des résultats similaires ont été obtenus chez le rat lorsque l'huile d'olive, riche en acides gras monoinsaturés est substitué à un régime riche en carbohydrates (Osada et al., 1991). Par contre, si ces acides gras sont remplacés par un régime riche en huile de poisson (contenant majoritairement des acides gras polyinsaturés n-3), les taux d'ARNm de l'apo A-I sont réprimés.

Le mécanisme de cette répression a ensuite été étudié dans des cultures primaires d'hépatocytes. Nos résultats montrent que l'acide docosanoehexaenoïque (DHA) et l'acide eicosanopentaenoïque (EPA), acides gras polyinsaturés n-3 contenus dans les huiles de poisson, répriment les taux d'ARNm de l'apo A-I. Le même effet est obtenu avec l' $\alpha$ -bromopalmitate. Cet acide gras synthétique n'est pas métabolisé comme les acides gras naturels par la  $\beta$ -oxydation. Il perturbe donc le métabolisme intracellulaire des acides gras et a un effet plus puissant. Nous avons montré que l'ajout d' $\alpha$ -bromopalmitate dans des cultures primaires d'hépatocytes de rat réprime les taux d'ARNm de l'apo A-I, de manière temps- et dose- dépendante. De plus, comme le montre l'expérience de nuclear run-on, cet effet est transcriptionnel. Parallèlement à cet effet sur l'apo A-I, l'enrichissement du régime en acides gras saturés, polyinsaturés n-6 et polyinsaturés n-3 provoque une induction des taux d'ARNm du gène de l'Acyl CoA Oxidase (ACO), impliqué dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Tugwood et al., 1992). Il a été montré que les effets des acides gras sur ce gène sont médiés par un facteur de transcription récemment isolé, le Peroxisome Proliferated Activated Receptor (PPAR) (Isseman et Green, 1990). Ce facteur pourrait également être impliqué dans l'effet des acides gras polyinsaturés n-3 sur l'expression du gène de l'apolipoprotéine A-I, mais ceci reste encore à démontrer. Outre les acides gras, d'autres composés ont été montrés comme activateurs du Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) (Gottlicher et al., 1992). C'est le cas des fibrates, médicaments hypolipémiants couramment utilisés (Gottlicher et al., 1992).

Chez le rat, la situation est comparable à celle observée pour les acides gras polyinsaturés n-3, puisque l'administration de fibrates résulte en une diminution des taux de HDL plasmatiques (Staels et al., 1992). Cette diminution est liée à une diminution de

la synthèse de l'apo A-I, résultant en une diminution de la sécrétion de l'apo A-I (Staels et al., 1992).

En utilisant les cultures primaires d'hépatocytes, nous avons montré que les différents fibrates réduisent les taux d'ARNm de l'apo A-I, tout comme les acides gras polyinsaturés n-3. De même, les fibrates induisent les taux d'ARNm de l'ACO. Ces effets sur le gène de l'ACO et de l'apo A-I sont transcriptionnels, comme le montre l'expérience de nuclear run-on. L'effet des fibrates sur les gènes de l'ACO et de l'apo A-I est dose- et temps- dépendant. Cependant, la cinétique d'activation du gène de l'ACO est différente de celle de l'apo A-I. En effet, les taux d'ARNm de l'ACO sont induits très rapidement, après 6 heures de traitement et l'activation diminue par la suite. L'inhibition des taux d'ARNm de l'apo A-I est plus graduelle dans le temps, atteignant un maximum après 24 heures de traitement.

Les fibrates sont, tout comme les acides gras, des activateurs de PPAR (Gottlicher et al., 1992). Ce facteur pourrait être le médiateur de l'effet répresseur des fibrates sur l'expression du gène de l'apo A-I de rat. Néanmoins, plusieurs éléments vont à l'encontre de cette hypothèse. D'abord, l'effet des fibrates n'est pas plus prononcé en présence de dexaméthasone, qui induit l'expression du gène PPAR $\alpha$  au niveau hépatique Lemberger et al., 1994; Hermansen et al., 1994). Par contre, les taux d'ARNm de l'ACO sont super-induits en présence de ces deux composés. Ensuite, différents activateurs de PPAR produisent des effets différents *in vivo*. Comme nous l'avons précédemment, les huiles d'olive induisent l'expression du gène de l'apo A-I, alors que les huiles de poisson la réprime. Ceci est également vrai *in vitro*, puisque dans la cellule HepG2, les différents activateurs de PPAR produisent des effets variables (Vu Dac et al., 1995). Enfin, concernant le mécanisme d'action des fibrates sur l'expression du gène de l'apo A-I, il a été montré dans la cellule HepG2, qu'il existe un site de réponse aux fibrates dans la partie proximale du promoteur de ce gène. Ce site est responsable de l'effet répresseur des fibrates (Vu Dac et al., 1995). Par contre, plus en aval du promoteur, il existe un site de réponse pour le PPAR $\alpha$ . Dans des expériences de transfections transitoires, lorsque le PPAR est cotransféré avec le promoteur de l'apo A-I, en présence de fibrates, cet effet est aboli. Ceci montre que le PPAR $\alpha$  contrecarre l'effet inhibiteur des fibrates sur l'expression du gène de l'apo A-I, en se fixant sur un site distinct (Vu Dac et al., 1995). Par contre, chez les rongeurs (souris ou rat) ce site est non fonctionnel (Klausing et al., 1995) (Figure 10).

La présence du site PPRE dans le promoteur humain pourrait expliquer l'effet des fibrates sur les HDL chez l'homme. Chez l'homme, l'administration de fibrates provoque généralement une augmentation des taux plasmatiques de HDL. Cet effet est plus prononcé chez les patients hypercholestérolémiques, possédant un taux de HDL bas (Malmendier et al., 1985; Balfour et al., 1990). Les fibrates semblent agir en augmentant les concentrations plasmatiques des apolipoprotéines constitutives des HDL, plus

particulièrement les apo A-I et A-II (Mellies et al., 1995). Des études effectuées chez les primates, montrent une augmentation de l'expression du gène de l'apo A-I après traitement aux fibrates (Sorci-Thomas et al., 1989). Des études réalisées chez des souris transgéniques pour l'apolipoprotéine A-I humaine ont montré qu'un traitement aux fibrates provoque une augmentation des taux plasmatiques et des taux d'ARNm de l'apo A-I humaine. Ceci est confirmé dans des cultures primaires d'hépatocytes humains, où un traitement aux fibrates provoque une induction des ARNm de l'apo A-I (Berthou et al., 1996). Dans le même temps, les taux d'ARNm endogènes de la souris sont eux diminués (Berthou et al., 1995). Chez ces souris, les gènes murin et humain de l'apo A-I possèdent leur promoteur respectif. Chez ces souris, l'effet activateur des fibrates résulte probablement de la présence d'un élément de réponse au PPAR fonctionnel dans le promoteur du gène humain.

Chez l'homme, l'effet des fibrates sur l'expression du gène de l'apo A-I pourrait donc résulter de la balance entre ces deux mécanismes : répression par les fibrates et activation par le PPAR. Chez le rat, du fait de l'absence d'un PPRE fonctionnel, l'effet des fibrates se traduit toujours par une baisse de l'expression du gène de l'apo A-I.

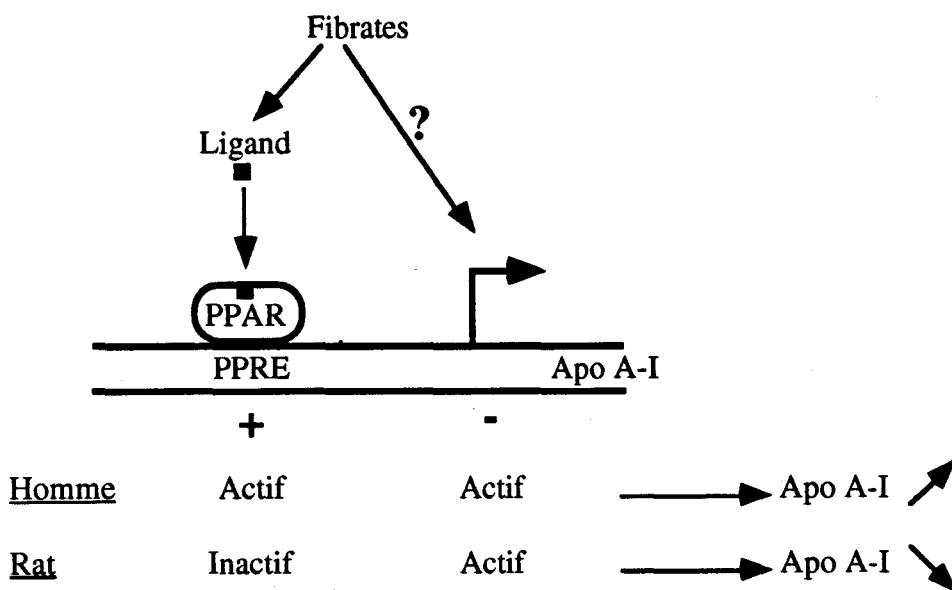


Figure 10 : Mécanisme d'action proposé pour la régulation de l'apo A-I par les fibrates

Chez l'homme, contrairement à l'apo A-I, la situation pour l'apo A-II est plus claire. Les fibrates, qui augmentent les concentrations plasmatiques de HDL, augmentent également les concentrations plasmatiques de l'apo A-II (Mellies et al., 1987). Dans la cellule HepG2, les fibrates induisent une augmentation des taux d'ARNm de l'apo A-II. De plus, en transfection transitoire dans ces cellules, l'activité du promoteur de l'apo A-II est induite par les fibrates (Vu Dac et al., 1995). Les fibrates agissent donc au niveau transcriptionnel sur le gène de l'apo A-II. L'apo A-II étant le facteur déterminant dans la

distribution de l'apo A-I dans les LpAI et les LpAI:AII (Ikewaki et al., 1995), cet effet induiteur des fibrates sur l'apo A-II pourrait expliquer l'augmentation des LpAI:AII par rapport aux LpAI observée après traitement aux fibrates (Bard et al., 1992).

La situation chez le rat est différente. En effet, un traitement aux fibrates s'accompagne d'une diminution de la synthèse de l'apo A-II (Staels et al., 1992). Les même auteurs ont montré que cet effet était lié à un mécanisme post-transcriptionnel. Dans des cultures primaires d'hépatocytes, nous avons montré que le fénofibrate, et pas les autres fibrates testés, réduit les taux d'ARNm de l'apo A-II, d'une manière dose- et temps- dépendante.

Chez l'homme et chez le rat, l'effet des acides gras sur l'expression du gène de l'apo A-II est mal documenté. Pourtant la démonstration d'un site PPRE dans le promoteur du gène humain de l'apo A-II, suggère que ce gène peut être régulé par des facteurs nutritionnels agissant par l'intermédiaire du PPAR, comme les acides gras. Dans cette étude, nous avons montré que chez le rat, le remplacement d'un régime riche en carbohydrates par un régime riche en acides gras polyinsaturés n-3 provoque une répression des taux d'ARNm de l'apo A-II. Par contre, le remplacement d'un régime riche en carbohydrates par un régime riche en acides gras saturés et polyinsaturés n-6 ne provoque pas d'effets significatifs sur les taux d'ARNm de l'apo A-II. L'effet répresseur des acides gras polyinsaturés n-3 n'est pas reproduit in vitro, sur des cultures primaires d'hépatocytes traitées avec de l'EPA ou du DHA, ainsi qu'avec de l' $\alpha$ -bromopalmitate, ce qui suggère un mécanisme d'action indirecte de ces composés sur l'expression du gène de l'apo A-II.

## B. RÉGULATION DU GÈNE DU PPAR

### B.1. Introduction

Comme nous venons de le voir, le PPAR $\alpha$  semble jouer un rôle important dans la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme des HDL. C'est pourquoi nous nous sommes ensuite intéressés à la régulation de son propre gène.

Les PPARs sont une famille de récepteurs nucléaires, appartenant à la super-famille des récepteurs nucléaires d'hormones. La structure de ces récepteurs est classique et se compose de cinq domaines : le domaine A/B, qui correspond à la zone de transactivation ligand-indépendante interagissant avec la machinerie transcriptionnelle de base, le domaine C qui permet la fixation à l'ADN, le domaine D, zone charnière qui permet le localisation nucléaire, le domaine E, dont le rôle essentiel est la fixation du ligand ainsi que la transactivation ligand-dépendante, et enfin, le domaine F dont la fonction précise n'est pas encore déterminée. A ce jour, différents PPAR possédant une expression tissulaire différente ont été caractérisés (Tableau 3).

Spécies	Type	Isoformes
Xénope	$\alpha$ $\beta$ $\gamma$	
Souris	$\alpha$ NUC-I $\gamma$ FAAR $\delta$	$\gamma_1$ and $\gamma_2$
rat	$\alpha$	
hamster		$\gamma$
homme	$\alpha$ NUC-I	$\gamma$

Tableau 3 : Nomenclature des différents types et isoformes de PPAR connus à ce jour

Les acides gras et les fibrates activent les différents PPAR (Isseman et al., 1993). L'effet des PPAR se produit après fixation sur un élément de réponse qui leur est spécifique, comme pour les autres récepteurs nucléaires d'hormones. Ce site, nommé PPRE, est localisé dans le promoteur des gènes cibles du PPAR. Parmi ces gènes, on retrouve ceux des enzymes peroxisomales et mitochondrielles (Dreyer et al., 1992; Zhang et al., 1993, Schoonjans et al., 1995), responsables du catabolisme des acides gras par  $\beta$ -oxydation, ou encore les gènes de deux protéines fixant les acides gras, FABP et aP2 (Isseman et al., 1992; Tontonoz et al., 1994). Plus récemment, dans notre laboratoire Vu Dac et al. et Schoonjans et al. ont montré que le PPAR régulait l'expression de trois gènes impliqués directement dans le métabolisme lipoprotéique, les gènes des apo A-I et A-II, ainsi que le gène de la LPL (Vu Dac et al., 1994; Vu Dac et al., 1995; Schoonjans et al., 1995). Un autre gène, impliqué dans le métabolisme des triglycérides, le gène de l'apo C-III a également été montré comme étant régulé par le PPAR (Hertz et al., 1995). Les PPAR semblent donc avoir des effets différents, ce qui pourrait expliquer leur expression tissu spécifique. En effet, le PPAR $\gamma$  est très fortement exprimé dans le tissu adipeux et existe à l'état de traces dans d'autres tissus comme le foie ou le cœur. Le PPAR $\alpha$  est lui exprimé fortement dans tous les tissus possédant une forte implication dans le métabolisme lipidique comme le foie, les reins, le tissu adipeux brun (pour revue, Wahli et al., 1995) Le PPAR $\gamma$  est impliqué dans la régulation du gène de la LPL au niveau du tissu adipeux. Par contre, le PPAR $\alpha$  médie l'effet des acides gras ou des fibrates sur le métabolisme lipidique au niveau hépatique. En effet, chez des souris où le gène du PPAR $\alpha$  a été muté par recombinaison homologue, on constate l'absence d'activation par les acides gras ou les fibrates sur des gènes cibles tels que le gène de l'ACO (Lee et al., 1995). Vu l'importance du PPAR $\alpha$  dans le métabolisme lipidique au

niveau hépatique, il serait donc également intéressant de voir si l'expression même de son gène pourrait être modulée par des facteurs tels que les hormones.

### B.2.2. Résultats et discussion

Dans notre laboratoire et d'autres, il a été montré, sur des cultures primaires d'hépatocytes, que le fénofibrate et les acides gras induisent l'expression du gène de l'ACO qui est un gène cible du PPAR (Sorensen et al., 1993; Berthou et al., 1995). Cet effet est beaucoup plus prononcé lorsque simultanément au fénofibrate, la dexaméthasone est rajoutée au milieu de culture. La dexaméthasone n'étant pas un activateur de PPAR, son effet pourrait s'expliquer par une régulation de l'expression du gène du PPAR.

En utilisant le même modèle cellulaire, nous avons donc voulu voir si la dexaméthasone était capable de réguler l'expression du gène du PPAR $\alpha$ . Sur les cultures primaires d'hépatocytes, nous avons montré que la dexaméthasone provoque une induction des taux d'ARNm du PPAR $\alpha$ . Cet effet est spécifique des glucocorticoïdes, car l'aldostérone, un minéralocorticoïde, n'a pas d'effet sur ces taux. De plus, le RU486, un inhibiteur compétitif des glucocorticoïdes abolit cet effet. L'addition simultanée d'actinomycine D, un inhibiteur de transcription, abolit l'effet activateur de la dexaméthasone sur les taux d'ARNm hépatiques du PPAR $\alpha$ , ce qui implique que la dexaméthasone intervient sur la régulation du gène du PPAR $\alpha$  au niveau transcriptionnel. Ceci est confirmé par l'expérience de nuclear run-on, où après 6 heures de traitement, la transcription du gène PPAR $\alpha$  est augmentée d'un facteur 5. Au contraire de l'apo A-I, dont la régulation par la dexaméthasone fait intervenir un mécanisme indirect (Saladin et al., 1995), la dexaméthasone agit probablement directement sur le gène du PPAR $\alpha$ , en activant le GR endogène. En effet, l'activation par la dexaméthasone n'est pas aboli en présence de cyclohéximide, un inhibiteur de traduction.

Comme les glucocorticoïdes régulent l'expression du gène du PPAR *in vitro*, il nous est apparu important de vérifier si un effet similaire existait *in vivo*, dans des conditions où les glucocorticoïdes sont hauts. Au niveau physiologique, la réponse au stress se traduit par une augmentation des quantités de glucocorticoïdes libérés par les surrénales et des catécholamines libérées par le système nerveux sympathique (Axelrod et Reisine, 1984). Chez le rat, le stress provoqué par 4 heures d'immobilisation, provoque une induction des taux d'ARNm hépatiques du PPAR $\alpha$ , qui est spécifique du foie, puisque l'hippocampe, qui posséde des récepteurs aux glucocorticoïdes, ne répond pas par une induction des taux d'ARNm du PPAR $\alpha$ . Cette induction pourrait donc nécessiter la présence de facteurs spécifiques du foie. L'activation du GR semble indispensable à cet effet, puisque l'injection de RU486 avant la période de stress abolit cet effet activateur. L'injection de dexaméthasone provoque une augmentation des taux d'ARNm du PPAR $\alpha$ , ce qui confirme les résultats obtenus *in vitro* sur des hépatocytes primaires traités à la

dexaméthasone (Lemberger et al., 1994). Le fait que la dexaméthasone agisse directement sur la transcription du gène du PPAR $\alpha$  suggère que les catécholamines n'interviennent probablement pas dans cet effet, et que l'activation résulte bien de l'action des glucocorticoïdes.

A l'état normal, le rat posséde un rythme circadien de ces taux de corticostéroïdes. En mesurant les taux d'ARNm du PPAR $\alpha$ , nous avons constaté que les pics de corticostéroïdes en fin de période diurne, étaient corrélés de manière reproductible avec un taux élevé d'ARNm de ce gène. Cette augmentation des taux d'ARNm du PPAR $\alpha$  est également corrélée avec une augmentation de la protéine PPAR $\alpha$ .

Enfin, pour voir si cet effet pouvait avoir une signification physiologique, nous avons mesuré l'expression d'un gène cible du PPAR $\alpha$ , l'ACO. Pour des raisons expérimentales, la durée du stress ne peut être prolongée indéfiniment. Sur des périodes de stress de 4 heures, les effets obtenus sur les gènes cibles n'étaient pas suffisamment probants. Sur cultures primaires d'hépatocytes, nous avons montré que le Wy 14463, un activateur de PPAR, induit les taux d'ARNm de l'ACO. En présence de dexaméthasone, seule, on observe une induction des taux d'ARNm et de la protéine du PPAR $\alpha$ . Par contre, ce traitement ne provoque pas d'effet sur le gène de l'ACO, comme attendu. En présence de dexaméthasone et de Wy 14463, une superinduction des taux d'ARNm de l'ACO est observée. Ceci confirme nos résultats précédents, obtenus sur hépatocytes primaires, concernant la super-induction de l'expression du gène de l'ACO par le fénofibrate, en présence de dexaméthasone (Berthou et al., 1995). Ces deux produits pourraient donc avoir une action consécutive, la dexaméthasone activant l'expression du gène du PPAR $\alpha$ , le fénofibrate l'activant. Ces résultats montrent que non seulement l'activation du PPAR est importante, mais également que son niveau d'expression, qui est modulable, détermine la réponse.

## C. RÉGULATION DU GÈNE DE L'*ob*

### C.1. Introduction

L'obésité se traduit par un stockage anormalement élevé de lipides représentant un désordre de la balance énergétique. Cette maladie est associée avec une hyperlipémie prédisposant à l'athérosclérose. L'obésité résulte de facteurs environnementaux et génétiques. Depuis quelques années, des efforts considérables ont été portés sur les facteurs génétiques responsables de cette maladie. En particulier, certaines mutations ont été associées avec le développement de l'obésité.

Parmi ces mutations, la mutation *ob* provoque chez la souris un développement précoce de l'obésité (Friedman et al., 1991). L'absence de ce gène et donc de sa protéine,

la leptine, semble être responsable du développement de l'obésité chez la souris (Halaas et al., 1995). Par contre, l'injection de cette protéine provoque, chez la souris une perte de poids, tant chez la souris normale, que chez la mutante (Halaas et al., 1995; Campfield et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995, Weigle et al., 1995; Rentsch et al., 1995). Des taux élevés d'ARNm de *l'ob* sont retrouvés chez les animaux dont la partie ventromédiane de l'hypothalamus a été retirée (VMH), ainsi que chez les souris *db/db* et le rat Zucker *fa/fa* (Ogawa et al., 1995; Maffei et al., 1995). Chez ces animaux, le développement de l'obésité observée, malgré la présence des ARNm de *l'ob*, semble indiquer l'absence ou la dysfonction d'un élément de la boucle de régulation, qui pourrait être le récepteur à la leptine. En effet, récemment, le récepteur à la leptine (OB-R) a été cloné (Tartaglia et al., 1995). De manière intéressante, ce récepteur est situé sur le même locus chromosomique que le gène *db*. Ce récepteur est exprimé principalement dans le plexus choroïde, le poumon et le rein, et en quantités plus réduites dans d'autres tissus comme l'hypothalamus (Tartaglia et al., 1995). Même si cela reste à démontrer, la leptine se fixerait sur son récepteur et le signal serait alors transmis pour l'arrêt de prise de nourriture. Ce mécanisme potentiel pourrait faire intervenir le NPY, puissant activateur de la prise de nourriture, puisque l'injection de leptine au niveau du cerveau inhibe la synthèse et la sécrétion de ce peptide (Stephens et al., 1995). Enfin, la leptine n'est plus le seul facteur de satiété connu. Récemment, un rôle identique a été démontré pour le GLP-1 (glucagon Like Peptide) (Turton et al., 1995). Ce facteur contrecarre également l'effet du NPY et pourraient interagir avec la leptine pour réguler la prise de nourriture.

Il est néanmoins évident que comprendre les mécanismes qui régissent l'expression du gène de *l'ob* pourrait revêtir un intérêt particulier pour comprendre les mécanismes moléculaires conduisant à l'obésité et à long terme aider à la mise au point de thérapies.

## C.2. Résultats et discussion

Les glucocorticoïdes sont des hormones dont le rôle sur le comportement alimentaire, en particulier la prise de nourriture, est bien connu. De plus, nous avons montré dans les chapitres précédents leur rôle dans le métabolisme lipidique. Ceci fait de ces hormones de bonnes candidates pour la régulation de gènes impliqués dans la prise de nourriture ou le métabolisme énergétique, en particulier le gène *ob*.

Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié l'effet des corticostéroïdes sur la prise de poids et de nourriture, ainsi que l'expression du gène *ob* chez le rat. Nos résultats montrent que l'injection sous cutanée d'hydrocortisone, provoque une baisse de poids chez les animaux contrôles par rapport aux animaux traités. Cette baisse de prise de poids est accompagnée d'une diminution de la prise de nourriture. Ces résultats vont dans le sens des effets connus des glucocorticoïdes sur le comportement alimentaire. A doses physiologiques, les glucocorticoïdes induisent la prise de nourriture, alors qu'à doses

pharmacologiques, ils la répriment (Devenport et al., 1989). Parallèlement à cet effet, les taux d'ARNm de l'*ob* dans le tissu adipeux sont induits de manière temps- dépendante, le taux d'induction maximal étant atteint après deux jours de traitement, et dose-dépendante. Le même effet inducteur est obtenu en utilisant la dexaméthasone et la triamcinolone, deux autres glucocorticoïdes. Dans des cultures primaires d'adipocytes, Murakami et al. ont décrit une induction des taux d'ARNm de l'*ob* après traitement à la dexaméthasone (Murakami et al., 1995). Ceci suggère que la dexaméthasone agit probablement directement sur le gène de l'*ob* pour réguler son expression.

Ces résultats montrent qu'une baisse de poids et de prise de nourriture est corrélée avec une induction dépendante du traitement aux glucocorticoïdes des taux d'ARNm de l'*ob* dans le tissu adipeux. Ceci est confirmé par le fait que chez les souris *ob/ob*, l'administration de glucocorticoïdes ne provoque pas de baisse de prise de poids (Mc Ginnis et al., 1987).

La leptine semble donc agir comme facteur de satiété (De Vos et al., 1995; Campfield et al., 1995) en réduisant la prise de nourriture de l'animal. En retour, on peut se demander si la prise de nourriture elle-même peut également réguler l'expression du gène *ob*. Chez le rat, nous avons montré qu'un jeûne d'une nuit provoque une réduction de moitié des taux d'ARNm du gène *ob* au niveau du tissu adipeux. Ces résultats confirment ceux obtenus par Trayhurn et al. sur la souris (Trayhurn et al., 1995). Cette induction est bien due à la prise de nourriture car elle apparaît dans le rythme nycthéméral de l'animal dans la période nocturne, au moment même où l'animal commence à prendre ses repas (Peret et al., 1973). Si les animaux sont mis à jeûne, les taux d'ARNm de l'*ob* au niveau du tissu adipeux diminuent ce qui pourrait être lié à une baisse de la taille du tissu adipeux. De plus, après une nuit de jeûne, l'apport de nourriture au début de la phase diurne induit rapidement la prise de nourriture et l'induction des taux d'ARNm de l'*ob* au niveau du tissu adipeux. Ceci confirme que l'induction de l'expression du gène *ob* est bien le résultat de la prise de nourriture et non pas de variations biologiques quelconques dues au rythme nycthéméral. Même si nos résultats ne montrent pas la corrélation avec la production de leptine, on peut supposer que pendant la nuit, la leptine s'accumule au fur et à mesure de la prise de nourriture jusqu'à un point limite où l'état de satiété doit apparaître chez l'animal, arrêtant sa prise de nourriture.

La prise de nourriture induit des changements hormonaux en particulier l'augmentation de l'insuline en période post-prandiale. C'est pour cette raison que nous avons étudié si l'effet de la nourriture était médié par l'insuline. L'injection d'insuline chez l'animal mis à jeûne pendant la nuit, suffit pour reproduire l'effet obtenu par la prise de nourriture. Cependant, cette injection est associée à une augmentation de l'apport intracellulaire de glucose (Cushmann, 1980), dont le rôle dans la régulation du gène *ob* pourrait légitimement être envisagé. Pour éviter ceci, nous avons réalisé un clamp hyperinsulinémique, ce qui permet d'injecter de l'insuline à l'animal, tout en gardant

constant, par perfusion, ses concentrations en glucose. Cette expérience est réalisée en donnant à l'animal une concentration de glucose équivalente à celle observée à jeûne (clamp hyperinsulinémique euglycémique), ou à concentration élevée de glucose (clamp hyperinsulinémique hyperglycémique). Chez ces rats, l'effet inducteur sur les taux d'ARNm de l'*ob* est conservé dans les deux conditions, au niveau du tissu adipeux. Ces résultats montrent que l'insuline, et pas le glucose est responsable de l'effet inducteur. Ceci est confirmé sur des cultures primaires d'adipocytes où un traitement à l'insuline provoque une induction des taux d'ARNm de l'*ob*. L'*ob* pourrait donc être le médiateur de l'insuline. En période post-prandiale, la production d'insuline pourrait activer la voie de la leptine et commander l'arrêt de prise de nourriture. Cette hypothèse est renforcée par la souris *fat/fat* : cette souris possède une mutation dans le gène codant pour la carboxypeptidase E, responsable de la maturation de la proinsuline en insuline. Cette souris développe rapidement une obésité, associée à une hyperproinsulinémie (Naggert et al., 1995). L'absence de l'insuline fonctionnelle dans la boucle de régulation précédemment citée pourrait en partie expliquer l'obésité développée par cette souris. En outre, ces résultats pourraient en outre expliquer pourquoi les souris C57BL/6J *ob/ob*, les rats Zucker *fa/fa* ou les rats VMH, tous trois hyperinsulinémiques et hyperphagiques, montrent des taux élevés d'ARNm d'*ob* au niveau adipeux (Trayhurn et al., 1995; Ogawa et al., 1995; Maffei et al., 1995). Même si ces animaux présentent clairement une réponse à l'insuline, l'obésité chez ces animaux s'expliquerait par l'absence d'une partie du mécanisme entraînant l'absence de régulation dans la prise de nourriture et le contrôle du poids : dans le cas des souris C57BL/6J *ob/ob*, par l'absence d'une leptine fonctionnelle; dans le cas des rats Zucker, par l'absence d'un effecteur fonctionnel et enfin, dans les rats VMH par l'absence des structures régulant la prise de nourriture et le contrôle du poids.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Le but de cette étude était d'étudier les mécanismes par lesquels les facteurs nutritionnels, hormonaux et pharmacologiques, interviennent dans des maladies comme l'athérosclérose et l'obésité, l'hypothèse étant qu'ils exercent leur action en régulant l'expression des gènes clés impliqués dans ces maladies.

Dans un premier temps, nous avons étudié la régulation du gène de l'apolipoprotéine A-I, un des constituants protéiques majeurs des HDL, dont les taux plasmatiques sont inversement corrélés au développement de l'athérosclérose. Nous avons montré que chez le rat, les glucocorticoïdes régulent l'expression de ce gène à un niveau transcriptionnel. Cette régulation nécessite la présence d'une protéine labile néosynthétisée tissu-spécifique. Nous avons ensuite montré que les fibrates, agents pharmacologiques hypolipémiants, et les acides gras, contrairement à la situation observée chez l'humain, répriment l'expression du gène de l'apolipoprotéine A-I.

Les fibrates et les acides gras activent un facteur de transcription récemment cloné, membre de la famille des récepteurs nucléaires d'hormones, le PPAR. Ce facteur médie l'effet de ces composés sur le métabolisme lipidique au niveau hépatique. Nous avons vu qu'il existe deux phénomènes importants pour l'activité optimale du PPAR. D'abord, la présence d'un de ces activateurs, mais également le niveau d'expression de son propre gène. En effet, nous avons montré que l'expression du gène du PPAR $\alpha$ , membre de la famille des PPARs, principalement exprimé au niveau hépatique, est régulée par les glucocorticoïdes, qui ne sont pas des activateurs de ce facteur. Ces hormones induisent l'expression du gène du PPAR $\alpha$  à un niveau transcriptionnel. Nous avons vu que la présence simultanée d'un activateur de PPAR, les fibrates ou les acides gras, et d'un inducteur du gène du PPAR, la dexaméthasone, permet d'obtenir un effet optimal sur les gènes cibles du PPAR $\alpha$  au niveau hépatique.

Enfin, nous avons étudié l'expression du gène *ob*, dont une mutation provoque chez la souris, le développement de l'obésité. Le produit de ce gène, la leptine, agit comme facteur de satiété et régule le métabolisme énergétique. Chez le rat, nous avons montré que les glucocorticoïdes provoquent une baisse de prise de poids et de nourriture, ce qui est corrélé avec une induction de l'expression du gène *ob*. En sens inverse, l'expression du gène *ob* est régulée par la nutrition de l'animal. L'expression de ce gène est induite par la prise de nourriture, cet effet étant médié par l'insuline.

L'ensemble de ces résultats montre que les facteurs nutritionnels, hormonaux et pharmacologiques dans le développement de l'athérosclérose et l'obésité, peuvent en partie être expliqués par une régulation de l'expression des gènes cibles impliqués dans ces maladies. Comprendre les mécanismes qui régulent l'expression de ces gènes pourrait donc permettre à terme le développement de nouvelles thérapies à effets plus ciblés.

## RÉFÉRENCES

- Abbott W.G.H., Howard B.V., Christin L. (1988). Short-term energy balance : relationship with protein, carbohydrate, and fat balances. *Am. J. Physiol.*, 255, E332-E337.
- Acheson K.J., Schutz Y., Bessard T., Flatt J.P., Jéquier E. (1987). Carbohydrate metabolism and de novo lipogenesis in human obesity. *Am. J. Clin. Nutr.*, 45, 78-85.
- Acheson K.J., Schutz Y., Bessard T., Anantharaman K., Flatt J.P., Jéquier E. (1988). Glycogen storage capacity and de novo lipogenesis during massive carbohydrate overfeeding in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, 48, 240-247.
- Acton S., Rigotti A., Landschulz K.T., Xu S., Hobbs H.H., Krieger M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 271, 518-520.
- Alaupovic P. McConathy W.J., Fesmire J., Tavella M., Bard J.M. (1988). Profiles of apolipoproteins and apolipoprotein-B containing lipoprotein particles in dyslipoproteinemias. *Clin. Chem.*, 34, B13-B27.
- Allan C.M., Fidge N.H., Morrison J.R., Kanellos J. (1993). Monoclonal antibodies to human apolipoprotein A-I : probing the putative receptor binding domain of apolipoprotein A-I. *Biochem. J.*, 10, 95-105.
- Alpert S. (1990). Growth, thermogenesis and hyperphagia. *Am. J. Clin. Nutr.*, 52, 784-792.
- Altschuler S., Conte A., Sebok M., Marlin R., Winick C. (1982). Three controlled trials of weight loss with phenylpropanolamine. *Int. J. Obes.*, 6, 549-556.
- Amri E.Z., Ailhaud G., Grimaldi P. (1991). Regulation of adipose cell differentiation. Kinetics of induction of the ap2 gene by fatty acids and modulation by dexamethasone. *J. Lipid Res.*, 32, 1457-1463.
- Apfelbaum M. (1967). Traitement de l'obésité par la diète protodique. *Entretiens de Bichat*, 1, 62.
- Apfelbaum T.F., Davidson N.O., Glickman R.M. (1987). Apolipoprotein A-IV synthesis in rat intestine : regulation by dietary triglyceride. *Am. J. Physiol.*, 252, G662-G666.
- Apostopoulos J.J., Howlett G.J., Fidge N. (1987). Effects of dietary cholesterol and hypothyroidism on rat apolipoprotein mRNA metabolism. *J. Lipid. Res.*, 28, 642-648.
- Archer T.K., Tam S.P., Deeley R.G. (1986). Kinetics of estrogen-dependent modulation of apolipoprotein A-I synthesis in human hepatoma cells. *J. Biol. Chem.*, 261, 5067-5074.
- Atger V., De la Liera Moya M., Bamberger M., Francone O., Cosgrove P., Tall A., Walsh A., Moatti N., Rothblat G. (1995). Cholesterol efflux potential of sera from mice expressing human cholesteryl ester transfer protein and/or human apolipoprotein A-I. *J. Clin. Invest.*, 96, 2613-2622.
- Axelrod J., Reisine T.D. (1984). Stress hormones : their interaction and regulation. *Science*, 224, 452-459.
- Bagatell C.J., Knopp R.H., Rivier J.E., Bremmer W.J. (1994). Physiological levels of estradiol stimulate plasma high density lipoprotein 2 cholesterol levels in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 78, 855-861.
- Balfour J.A., Mc Tavish D., Heel R.C. (1990). Fenofibrate, a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in dyslipidemia. *Drugs*, 40, 260-290.
- Bandini L.G., Schoeller D.A., Cyr H., Dietz W.H. (1990). Validity of reported energy intake in obese and non-obese adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.*, 52, 421-425.

Barbaras R., Puchois P., Fruchart J.C., Ailhaud G. (1987). Cholesterol efflux from cultured adipose cell is mediated by LpAI particles but not by LpAI:AII particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142, 63-69.

Barbaras R., Puchois P., Fruchart J.C., Pradines-Figueres A., Ailhaud G. (1990). Purification of an apolipoprotein. A binding protein from mouse adipose cells. *Biochem J.*, 269, 767-773.

Bard J.M., Parra H.J., Camare R., Luc G., Ziegler O., Dachet C., Bruckert E., Douste-Blazy P., Drouin P., Jacotot B., De Gennes J.L., Keller U., Fruchart J.C. (1992). A multicenter comparison of the effects of simvastatin and fenofibrate therapy in severe primary hypercholesterolemia, with particular emphasis on lipoproteins defined by their apolipoprotein composition. *Metabolism*, 41, 498-503.

Bartlett S.M., Gibbons G.F. (1988). Short- and longer-term regulation of very low density lipoprotein secretion by insulin, dexamethasone and lipogenic substrates in cultured hepatocytes (A biphasic effect of insulin). *Biochem. J.*, 249, 37-43.

Barrett-Connor E.L. (1985). Obesity, atherosclerosis and coronary artery disease. *Ann. Intern. Med.*, 103, 1010-1019.

Bartlett S.M., Gibbons G.F. (1988). Short- and longer-term regulation of very-low-density lipoprotein secretion by insulin, dexamethasone and lipogenic substrates in cultured hepatocytes. A biphasic effect of insulin. *Biochem. J.*, 249, 37-43.

Baum C.L., Teng B.B., Davidson N.O. (1990). Apolipoprotein B messenger RNA editing in the rat liver. Modulation by fasting and refeeding a high carbohydrate diet. *J. Biol. Chem.*, 265, 19263-19270.

Berg A.L., Nilsson-Ehle P. (1994); Direct effects of corticotropin on plasma lipoprotein metabolism in man. Studies in vivo and in vitro. *Metabolism*, 43, 90-97.

Berlan M., Barbe P., Stich V., Galitzky J., Bousquet-Mélou A., Lafontan M. (1995). Lipomobilisation, aspects physiopathologiques et pharmacologiques. *Annales d'Endocrinologie*, 56, 97-100.

Berthou L., Staels B., Saldicco I., Berthelot K., Casey J., Fruchart J.C., Denèfle P., Branellec D. (1994). Opposite in vitro and in vivo regulation of apolipoprotein A-I gene expression by retinoic acid. Absence of effects on apolipoprotein A-II gene expression. *Arterio. Thromb.*, 14, 1657-1664.

Berthou L., Duverger N., Emmanuel F., Auwerx J., Fruchart J.C., Denèfle P., Staels B., Branellec D. (1995a). Opposite regulation of human versus mouse apo A-I by fibrates in human apo A-I transgenic mice. *Circulation*, 92, 495.

Berthou L., Duverger N., Emmanuel F., Langouët S., Auwerx J., Guillouzo A., Fruchart J.C., Rubin E., Denèfle P., Staels B., Branellec D. (1996). Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apo A-I transgenic mice. submitted.

Bertolini S., Elicio N., Daga A., Degli'Innocenti M.L., Balestrasi R., Fusi M.G., Cotta-Ramusino A.M., Carozzi A. (1988). Effect of a single daily dose treatment of fenofibrate on plasma lipoproteins in hyperlipoproteinemia IIb. *Eur. J. Clin. Pharmac.*, 34, 25-28.

Blundell J.E., Burley V.J., Cotton J.R., Lawton C.L. (1993). Dietary fat and the control of energy intake : evaluating the effects of fat on meal size and postmeal satiety. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57, 772S-778S.

Bocharov A.V., Huang W., Vishniakova T.G., Zaitseva E.V., Frolova E.G., Rampal P., Bertolotti R. (1995). Glucocorticoids upregulate high affinity, high density lipoprotein binding sites in rat hepatocytes. *Metabolism*, 44, 730-738.

Boogaerts J.R., Malone-McNeal M., Archambault-Schexnayder J., Davis R.A. (1984). Dietary carbohydrate induces lipogenesis and very-low-density lipoprotein synthesis. *Am. J. Physiol.*, 246, E77-E83.

Borkan G.A., Gerzof S.G., Robbins A.H., Hults D.E., Silbert C.K., Silbert J.E. (1982). Assessment of abdominal fat content by computed tomography. *Am. J. Clin. Nutr.*, 36, 172-177.

Bouchard C. (1991). Current understanding of the etiology of obesity : genetic and nongenetic factors. Am. J. Clin. Nutr., 53, 1561S-1565S.

Bouchard C. (1995). Genetics of obesity : an update on molecular markers. Int. J. Obes., 19, S10-S13.

Bouchard C., Tremblay A., Nadeau A. (1989). Genetic effect in resting and exercise metabolic rates. Metabolism, 38, 364-370.

Bourgeois C.S., Wiggins D., Hems R., Gibbons G.F. (1995). VLDL output by hepatocytes from obese Zucker rats is resistant to the inhibitory effect of insulin. Am. J. Physiol., 269, E208-E215.

Bray G.A. (1985). Genetic and hypothalamic mechanisms for obesity-finding the needle in the haystack. Am. J. Clin. Nutr., 50, 891-902.

Bray G.A. (1991). Treatment for obesity : a nutrient balance/nutrient partition approach. Nutr. Rev., 49, 33-45.

Breslow J.L. (1993). Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 8314-8318.

Brewer H., Fairwell T., La Rue A., Ronan R., Houser A., Bronzert T. (1978). The amino-acid sequence of human apo A-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. Biochem. Biophys. Res. Comm., 80, 623-630.

Briggs M.R., Yokohama C., Wang X., Brown M.S., Goldstein J.L. (1993). Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. J. Biol. Chem., 268, 14490-14496.

Brousseau M.E., Ordovas J.M., Osada J., Fasulo J., Robins S.J., Nicolosi R.J., Schaefer E.J. (1995). Dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids are comparable in their effects on hepatic apolipoprotein mRNA abundance and liver lipid concentrations when substituted for saturated fatty acids in cynomolgus monkeys. J. Nutr., 125, 425-436.

Brousseau M.E., Schaefer E.J., Stucchi A.F., Osada J., Vespa D.B., Ordovas J.M., Nicolosi R.J. (1995). Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance apolipoprotein A-I catabolism but do not affect either its production or hepatic mRNA abundance in cynomolgus monkeys. Atherosclerosis, 115, 107-119.

Brown M.S., Goldstein J.L. (1990). Scavenging for receptors. Nature, 343, 508-509.

Brownell K.D., Wadden T.A. (1991). The heterogeneity of obesity : fitting treatments to individuals. Behav. Ther., 22, 153-177.

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

Bultman S.J., Michaud E.J., Woychik R.P. (1992). Molecular characterization of the mouse agouti locus. Cell, 71, 1195-1204.

Campfield L.A., Smith F.J., Guisez Y., Devos R., Burn P. (1995). Recombinant mouse ob protein : evidence for a peripheral signal lacking adiposity and central neural networks. Science, 269, 546-549.

Carlson T.L., Kottke B.A. (1991). Apo A-I secretion by rabbit intestinal mucosa cell cultures. Lipids, 26, 685-688.

Catapano A.L. (1987). Binding sites for HDL and HDL catabolism. Atherosclerosis, 16, 109-123.

Chan J., Nakabayashi H., Wong N.C.W. (1993). HNF-4 increases activity of the rat apo A-I gene. Nuc. Acid Res., 21, 1205-1211.

Chascione C., Elwyn D.H., Davila M., Gil K.M., Askanazi J., Kinney J.M. (1987). Effect of carbohydrate intake on de novo lipogenesis in human adipose tissue. Am. J. Physiol., 253, E664-E669.

Chen M., Breslow J.L., Leff T. (1994). Transcriptional regulation of the apo C-III gene by insulin in diabetic mice : correlation with changes in plasma triglyceride levels. *J. Lipid Res.*, 35, 1918-1924.

Cheung M.C., Albers J.J. (1984). Characterization of lipoproteins particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but not A-II. *J. Biol. Chem.*, 259, 12201-12209.

Cheung M.C., Wolf A.C., Lum K.D., Tollefson J.H., Albers J.J. (1986). Distribution and localization of lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesterol ester transfer activity in A-I containing lipoproteins. *J. Lipid Res.*, 27, 1135-1144.

Cheung M.C., Austin M.A., Moulin P., Wolf A.C., Cryer D., Knopp R.H. (1993). Effects of pravastatin on apolipoprotein-specific high density lipoprotein subpopulation and low density lipoprotein subclass phenotypes in patients with primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 102, 107-119.

Chirico A.M., Stunkard A.J. (1960). Physical activity and human obesity. *N. Engl. J. Med.*, 263, 935-940.

Clément K., Vaisse C., Manning B.S.J., Basdevant A., Guy-grand B., Ruiz J., Silver K.D., Shuldiner A.R., Froguel P., Strosberg A.D. (1995). Genetic variation in the β3-adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *New Engl. J. Med.*, 333, 352-354.

Coleman D.L. (1978). Obese and diabetes ; two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*, 14, 141-148.

Coleman D.L., Eicher E.M. (1990). Fat (fat) and tubby (tub) : two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. *J. Hered.*, 81, 424-427.

Considine R.V., Considine E.L., Williams C.J., Nyce M.R., Magosin S.A., Bauer T.L., Rosato E.L., Colberg J., Caro J.F. (1995). Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. *J. Clin. Invest.*, 95, 2986-2988.

Considine R.V., Madhur M.K., Heiman M.L., Kriauciunas A., Stephens T.W., Nyce M.R., Ohannessian J.P., Marco C.C., McKee L.J., Bauer T.L., Caro J.F. (1996). Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New Engl. J. Med.*, 334, 292-295.

Cook K.S., Spiegelman B.M. (1987). Adipsin, a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic neve. *Science*, 237, 402-404.

Corbett S.W., Stern J.S., Keesey R.E. (1986). Energy expenditure of rats with diet-induced obesity. *Am. J. Clin. Nutr.*, 44, 173-180.

Corbett S.W., Wilterdink E.J., Keesey R.E. (1985). Resting oxygen consumption in over- and underfed rats with lateral hypothalamic lesions. *Physiol. Behav.*, 35, 971-977.

Cosentini R., Blasi F., Trinchera M., Sommariva D., Fasoli A. (1989). Inhibition of cholesterol biosynthesis in freshly isolated blood mononuclear cells from normolipidemic subjects and hypercholesterolemic patients treated with bezafibrate. *Atherosclerosis*, 79, 253-255.

Cushman S.W., Wardzala L.J. (1980). Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. *J. Biol. Chem.*, 255, 4758.

Dallongeville J., Fruchart J.C., Pfister P., Bard J.M. (1994). Fluvastatin reduces levels of plasma apo-B containing particles and increases those of LpAI. *Am. J. Med.*, 96, 32S-36S.

Dashti N. (1992). The effect of low density lipoproteins, cholesterol, and 25-hydroxycholesterol on apolipoprotein B gene expression in Hep G2 cells. *J. Biol. Chem.*, 267, 7160-7169.

Dashti N., Smith E.A., Alaupovic P. (1990). Increases production of apolipoprotein B and its lipoproteins by oleic acid in Caco-2. *J. Lipid Res.*, 31, 113-123.

Dashti N., Williams D.L., Alaupovic P. (1989). Effects of oleate and insulin on the production rates and cellular mRNA concentrations of apolipoproteins in Hep G2 cells. *J. Lipid Res.*, 30, 1365-1373.

Davidson N.O., Caarlos R.C., Drewek M.J., Parmer T.G. (1998). Apolipoprotein gene expression in the rat is regulated in a tissue-specific manner by thyroid hormone. *J. Lipid Res.*, 29, 1511-1522.

DavidsonN.O., Magun A.M., Brasitus T.A., Glickman R.M. (1987). Intestinal apolipoprotein A-I and B48 metabolism : effects of sustained alterations in dietary triglycerides and mucosal cholesterol flux. *J. Lipid Res.*, 28, 388-402.

Davis R.A., Malone-Mc Neal M. (1985). Dietary cholesterol does not affect the synthesis of apolipoprotein B and E by rat hepatocytes. *Biochem.*, 227, 29-35.

Deckelbaum R.J., Eisenberg S., Oschry Y., Granot E., Sharon I., Olivecrona G. (1986). Conversion of human plasma HDL2 to HDL3. Roles of neutral lipid exchange and triglycerides lipases. *J. Biol. Chem.*, 261, 5201-5208.

De Lamatre J.G., Roheim P.S. (1983). The response of apolipoprotein IV to cholesterol feeding in rats. *Biochem. Biophys. Acta*, 751, 210-217.

Deslypere J.P. (1995). Obesity and cancer. *Metabolism*, 44, 24-27.

Després J.P., Ferland M., Moorjani S. (1989). Role of hepatic-triglyceride lipase activity in the association between intraabdominal fat and plasma HDL-cholesterol in obese women. *Arteriosclerosis*, 9, 485-492.

Després J.P., Lesage M., Lemieux S., Prud'homme D. (1995). Groupement de facteurs de risque pour les maladies cardio-vasculaires dans l'obésité viscérale. *Ann. Endocrinol.*, 56, 101-105.

Devenport L., Knehans A., Sundstrom A., Thomas T. (1989). Corticosterone's dual metabolic actions. *Life Sci.*, 45, 1389-1396.

De Vos P., Saladin R., Auwerx J., Stael B. (1995). Induction of ob gene expression by corticosteroids, is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J. Biol. Chem.*, 27, 15958-15961.

Diaz-Guerra M.J.M., Bergot M.O., Martinez A., Cuif M.H., Kahn A., Raymondjean M. (1991). Localisation of the carbohydrate response element of the rat L-type pyruvate kinase gene. *J. Biol. Chem.*, 266, 8679-8682.

Dreyer C., Krey G., Givel F., Helftenbein G., Wahli W. (1992). Control of the peroxisomal β-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, 68, 879-887.

Duchateau P., Rader D., Duverger N., Theret N., De Geitere C., Brewer Jr. H.B., Fruchart J.C., Castro G. (1993). Tangier disease : isolation and characterization of LpA-I, LpA-II, LpA-I:A-II and LpA-IV particles from plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, 1182, 30-36.

Duriez P., Fruchart J.C. (1984). Dosage des lipoprotéines définies selon leur composition en apolipoprotéines en vue de la prediction du risque cardiovasculaire. *Ann. Biol. Clin.*, 52, 179-183.

Eisenberg G. (1984). High density lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.*, 25, 1017-1058.

Elshourbagy N.A., Boguski M.S., Liao W.S.L., Jefferson L.S., Gordon J.I., Taylor J.M. (1985a). Expression of rat apolipoprotein A-IV and A-I genes : mRNA induction during development and in response to glucocorticoids and insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 8242-8246.

Endo A., Tsujita Y., Kuroda M., Tanzawa K. (1979). Effects of ML-236B on cholesterol metabolism in mice and rats : lack of hypocholesterolemic activity in normal animals. *Biochim. Biophys. Acta*, 575, 266-276.

Ettinger W.H., Klinefelter H.F., Kwiterovich P.O. (1987). Effect of short term, low dose corticosteroids on plasma lipoprotein lipids. *Atherosclerosis*, 63, 167-172.

Felgines C., Serouge C., Mathe D., Mazur A., Lutton C. (1994). Effect of simvastatin treatment on plasma apolipoprotein and hepatic apolipoprotein mRNA levels in the genetically hypercholesterolemic rat (RICO). *Life Sci.*, 54, 361-367.

Ferraro R., Lillioja S., Fontvieille A.M., Rising R., Bogardus C., Ravussin E. (1992). Lower sedentary metabolic rate in women compared to men. *J. Clin. Invest.*, 90, 780-784.

Fidge N.H., Nestel P.J. (1985). Identification of apolipoproteins involved in the interaction of human high density lipoprotein with receptors on cultured cells. *J. Biol. Chem.*, 260, 3570-3575.

Fielding C.J., Shore V.G., Fielding P.E. (1972). A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46, 1493-1498.

Fielding C.J., Fielding P.E. (1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.*, 36, 221-228.

Fink M., Shapiro D.M., Itil T.M. (1971). EEG profiles of fenfluramine, amobarbital and dextroamphetamine in normal volunteers. *Psychopharmacologia*, 22, 369-383.

Fisler J.S., Warden C.H., Pace M.J., Lusis A.J. (1993). BSB : a new mouse model of multigenic obesity. *Obesity Research*, 1, 271-280.

Flatt J.P., Ravussin E., Acheson K.J., Jéquier E. (1985). Effects of dietary fat on postprandial substrate oxidation and on carbohydrate and fat balances. *J. Clin. Invest.*, 76, 1019-1024.

Forbes G.B., Gallup J., Hursch J.B. (1961). Estimation of total body fat from potassium-40 content. *Science*, 133, 101-102.

Forman B.M., Tontonoz P., Chen J., Brun R.P., Spiegelman B.M., Evans R.M. (1995). 15-deoxy-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR $\gamma$ .

Francone O.L., Gong E.L., Ng D.S., Fielding C.J., Rubin E.M. (1995). Expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase in transgenic mice. Effect of human apolipoprotein A-I and human apolipoprotein A-II on plasma lipoprotein cholesterol metabolism. *J. Clin. Invest.*, 96, 1440-1448.

Frederich R.C., Löllmann B., Hamann A., Napolitano-Rosen A., Kahn B.B., Lowell B.B., Flier J.S. (1995). Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity; *J. Clin. Invest.*, 96, 1658-1663.

Friedman J.M., Leibel R.L., Siegel D.S., Walsh J., Bahary N. (1991). Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics*, 11, 1054-1062.

Friedman M.I., Tordoff M.G., Ramirez I. (1986). Integrated metabolic control of food intake. *Brain Res. Bull.*, 17, 855-859.

Fruchart J.C., Davignon J., Bard J.M., Grothe A.M., Richard A., Fievet C. (1987). Effect of fenofibrate treatment on type III hyperlipoproteinemia. *Am. J. Med.*, 83, 71-74.

Fruchart J.C., Ailhaud G., Bard J.M. (1993). Heterogeneity of high density lipoprotein particles. *Circulation*, 87, III-22-III-27.

Fruchart J.C., De Geteire C., Castro G.R. (1994). Apolipoprotein A-I containing particles and reverse cholesterol transport : evidence for connection between cholesterol efflux and atherosclerosis risk. *Atherosclerosis*, 110, S35-S39.

Galetta F., Sampietro T., Basta G., Bionda A. (1994). Effects of pravastatin on serum lipids, apoproteins, and lipoprotein (a) in primary hypercholesterolemia. *Minerva Med.*, 85, 321-326.

Garrison R.J., Kannel W.B., Feinleib M. et al. (1978). Cigarette smoking and HDL cholesterol : The Framingham offsprings study. *Atherosclerosis*, 30, 17-.

Gebel T., Arand M., Oesch F. (1992). Induction of the peroxisome proliferator activated receptor by fenofibrate in rat liver. *FEBS Lett.*, 309, 37-40.

Geffroy S., De Vos P., Staels B., Duban B., Auwerx J., De Martinville B. (1995). Localization of the human ob gene to chromosome 7q32 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 28, 603-604.

Ginsberg H., Olefsky J.M., Kimmerling G., Crapo P., Reaven G.M. (1976). Induction of hypertriglyceridemia by a low-fat diet. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 42, 729-735.

Ginsburg G.S., Ozer J., Karathanasis S.K. (1995). Intestinal apolipoprotein A-I gene transcription is regulated by multiple distinct DNA elements and is synergistically activated by the orphan nuclear receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4. *J. Clin. Invest.*, 96, 528-538.

Go M.F., Schonfeld G., Pfleger B., Cole T.G., Sussman N.L., Alpers D.H. (1988). Regulation of intestinal and hepatic apoprotein synthesis after chronic fat and cholesterol feeding. *J. Clin. Invest.*, 81, 1615-1620.

Goodal E., Feeney S., McGuirk J., Silverstone T. (1992). A comparison of the effect of d- and l-fenfluramine and d-amphetamine on energy and macronutrient intake in human subjects. *Psychopharmacology*, 106, 221-227.

Gordon J.I., Smith D.P., Andy R., Alpers D.H., Schonfeld G., Strauss A.W. (1982). The primary translation product of rat intestinal apolipoprotein A-I mRNA is an unusual preprotein. *J. Biol. Chem.*, 257, 971-978.

Gordon J.I., Sims H.F., Lentz S.R., Edelstein C., Scanu A.M., Strauss A.W. (1985). Extracellular processing of apolipoprotein A-II in HepG2 cells cultures is mediated by 54 kDa protease immunologically related to cathepsin B. *J. Biol. Chem.*, 260, 14824-14831.

Gordon D.J., Probstfield J.L., Garrison R.J., Neaton J.D., Castelli W.P., Knoke J.D., Jacobs D.R. Jr., Bangdiwala S., Tyroler H.A. (1989). High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease : four prospective American studies. *Circulation*, 79, 8-15.

Gottlicher M., Widmark E., Li Q., Gustafsson J.A. (1992). Fatty acids activate chimera of the clofibrate acid-derived receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 4653-4657.

Grundy S.M. (1994). Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.*, 60, 986S-990S.

Grundy S.M., Florentin L., Nix D., Whelan M.F. (1988). Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for reducing raised levels of plasma cholesterol in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, 47, 965-969.

Grundy S.M., Denke M.A. (1990). Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J. Lipid Res.*, 31, 1149-1172.

Grundy S.M., Mok H.Y., Zech L. (1979). Transport of very low density lipoprotein triglycerides in varying degrees of obesity and hypertriglyceridemia. *J. Clin. Invest.*, 63, 1274-.

Guettet C., Mathe D., Navarro N., Lecuyer B. (1989). Effect of chronic glucagon administration on rat lipoprotein composition. *Biochem. Biophys. Acta*, 1005, 233-238.

Guettet C., Rostaquini N., Navarro N., Lecuyer B., Mathe D. (1991). Effect of chronic glucagon administration on the metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins in rats fed high sucrose diet. *J. Nutr.*, 121, 24-30.

Halaas J.L., Gajiwala K.S., Maffei M., Cohen S.L., Chait B.T., Rabinowitz D., Lallone R.L., Burley S.K., Friedman J.M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269, 543-546.

Halachmi S., Marden E., Martin G., MacKay H., Abbondanza C., Brown M. (1994). Estrogen receptor-associated proteins : possible mediators of hormone-induced transcription. *Science*, 264, 1455-1458.

Hamilton B.S., Paglia D., Kwan A.Y.M., Deitel M. (1995). Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nature Medicine*, 2, 953-956.

Hara H., Yokohama S. (1991). Interaction of free apolipoproteins with macrophages; Formation of high density lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J. Biol. Chem.*, 266, 3080-3086.

Harnish D.C., Malik S., Karathanasis S.K. (1994). Activation of apolipoprotein A-I gene transcription by the liver enriched factor HNF-3. *J. Biol. Chem.*, 269, 28220-28226.

Havel R.J., Kaine J.P. (1989). Structure and metabolism of plasma lipoproteins. In *The metabolic basis of inherited disease*. Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson D.S., Mc Graw-Hill, New York (1989), 1129-1138.

Hayek T., Masucci-Magoulas L., Jiang X., Walsh A., Rubin E., Breslow J.L., Tall A.R. (1995). Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *J. Clin. Invest.*, 96, 2071-2074.

He Y., Chen H., Quon M.J., Reitman M. (1995). The mouse obese gene. Genomic organization, promoter activity, and activation by CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J. Biol. Chem.*, 270, 28887-28891.

Heller F., Harvengt C. (1983). Effects of clofibrate, bezafibrate, fenofibrate, and probucol on plasma lipolytic enzymes in normolipidaemic subjects. *Eur. J. Clin. Pharmac.*, 23, 57-63.

Hermansen Steineger H., Nebb Sorensen H., Tugwood J.D., Skrede S., Spydevold O., Gautvik K.M. (1994). Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. Hormonal modulation of fatty-acid-induced transcription. *Eur. J. Biochem.*, 225, 967-974.

Hertz R., Bishara-Shieban J., Bar-Tana J. (1995). Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III. *J. Biol. Chem.*, 270, 13470-13475.

Herz J., Hamann U., Rogne S., Myklebost O., Gausepohl H., Stanley K.K. (1988). Surface location and high affinity for calcium of a 500 Kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.*, 7, 4119-4127.

Hoebel B.G. (1988). Neuroscience and motivation : pathways and peptides that define motivation. In : Atkinson R.C., Herrnstein R.J., Lindzey G., Luce R.D., eds. *Steven's handbook of experimental psychology*. New York : John Wiley & Sons, 547-625.

Hoebel B.G., Leibowitz S.F. (1981). Brain monoamines in the regulation of self-stimulation, feeding and body weight. In : Weiner H., Hofer M.A., Stunkard A.J., eds. *Brain, behavior & bodily disease*. New York : Association for research in Nervous and Mental Disease, Raven Press, 103-142.

Howard B.V. (1987). Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J. Lipid Res.*, 28, 613-628.

Huff M.W., Telford D.E. (1989). Dietary fish oil increases conversion of very low density lipoprotein apoprotein B to low density lipoprotein. *Arteriosclerosis*, 9, 58-66.

Ikewaki K., Zech L.A., Kindt M., Brewer B., Rader D.J. (1995). Apolipoprotein A-II production rate is a major factor regulating the distribution of apolipoprotein A-I among HDL subclasses LpAI and LPAI:AII in normolipidaemic humans. *Arterioscler. Thromb.*, 15, 306-312.

Inui Y., Hausman A.M.L., Nanthakumar N., Henning S.J., Davidson N.O. (1992). Apolipoprotein B messenger RNA editing in rat liver : developmental and hormonal modulation is divergent from apolipoprotein A-IV gene expression despite increased hepatic lipogenesis. *J. Lipid Res.*, 34, 309-315.

Isse N., Ogawa Y., Tamura N., Masuzaki H., Mori K., Okazaki T., Satoh N., Shigemoto M., Yoshimasa Y., Nishi S., Hosoda K., Inazawa J., Nakao K. (1995). Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J. Biol. Chem.*, 270, 27728-27733.

Isseman I., Green S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferator. *Nature*, 347, 645-650.

Isseman I., Prince R.A., Tugwood J.D., Green S. (1992). A role for fatty acids and liver fatty acid binding protein in peroxisome proliferation. *Biochem. Soc. Trans.*, 20, 824-827.

Isseman I., Prince R.A., Tugwood J.D., Green S. (1993). The peroxisome proliferator-activated receptor : retinoic X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs. *J. Molec. Endocrinol.*, 11, 37-47.

Jacq X., Brou C., Davidson I., Chambon P., Tora L. (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFDIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell*, 79, 107-117.

Jahn C.E., Osborne J.J.C., Schaeffer E.J., Brewer J.H.B. (1983). Activation of the enzymatic hepatic lipase by apo A-II. *Eur. J. Biochem.*, 131, 25-29.

Jansen H., Van Tol A., Auwerx J., Skretting G., Staels B. (1992). Opposite regulation of hepatic lipase and lecithin:cholesterol acyltransferase by glucocorticoids in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 1128, 181-185.

Jequier E., Acheson K., Schutz Y. (1987). Assessment of energy expenditure and fuel utilization in man. *Ann. Rev. Nutr.*, 7, 187-208.

Jump D.B., Clarke S.D., Mac Dougald O.A. (1993). Polyunsaturates fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 8454-8458.

Kaptein A., De Wit E.C.M., Princen H.M.G. (1993). Retinoids stimulate apo A-I synthesis by induction of gene transcription in primary hepatocyte cultures from cynomolgus monkey (*macaca fascicularis*). *Arterio. Thrombo.*, 13, 1505-1514.

Karathanasis S.K., Zannis V.I., Breslow J.L. (1983). Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 6147-6151.

Karathanasis S.K. (1985). Apolipoprotein multigene family and tandem organization of human apolipoprotein A-I, C-III and A-IV genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 6374-6378.

Kasim S.E., Elovson J., Khilnani S., Almario R.U., Jen K.L. (1993). Effect of lovastatin of very low density lipoprotein lipids and apolipoprotein B in the hypertriglyceridemic Zucker obese rat. *Atherosclerosis*, 104, 147-152.

Kasim-Kasaras S.E. (1995). Impact of n-3 fatty acids on lipoprotein metabolism. *Curr. Op. Lipid.*, 6, 167-171.

Katan M.B., Zock P.L., Mensink R.P. (1994). Effects of fats and fatty acids on blood lipids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 60, 1017S-1022S.

Keesey R.E., Corbett S.W. (1990). Adjustments in daily energy expenditure to caloric restriction and weight loss by adult obese and lean Zucker rats. *Int. J. Obes.*, 14, 1079-1084.

Keys A. (1980). Overweight, obesity, coronary heart disease and mortality. *Nutr. Rev.*, 38, 297.

Kim M.H., Nakayama R., Manos P., Tomlinson J.E., Choi E., Ng J.D., Holten D. (1989). Regulation of apolipoprotein E synthesis and mRNA by diet and hormones. *J. Lipid Res.*, 30, 663-671.

Kissileff H.R., Gruss L.P., Thornton J., Jordan H.A. (1984). The satiating efficiency of foods. *Physiol Behav.*, 32, 319-332.

Klausing K., Straney R., Briggs M. (1995). The human apolipoprotein A-I promoter contains a novel PPRE. *Circulation*, 92, 1386.

Kleiber M. (1975). *The fire of life : an introduction to animal energetics*. Huntington, NY : Robert E., Krieger Co.

Kleibig M.L., Wilkinson J.G., Geisler J.G., Woychik R.P. (1995). Ectopic expression of the agouti gene in transgenic mice cause obesity, feature of type II diabetes and yellow fur. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 4728-4732.

Kliwewer S.A., Lenhard J.M., Willson T.M., Patel I., Morris D.C., Lehmann J.M. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  and promotes adipocyte differentiation. *Cell*, 83, 813-819.

Kowal R.C., Herz J., Goldstein J.L., Esser V., Brown M.S. (1989). Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesterol esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 5810-5814.

Kramer F.M., Jeffery R.W., Forster J.L., Snell M.K. (1989). Long-term follow-up of behavioral treatment for obesity : patterns of weight regain in men and women. *Int. J. Obes.* 13, 123-136.

Kuczmarski R.J. (1992). Prevalence of overweight and weight gain in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.*, 49(S-502S).

Kung A.W., Pang R.W., Lauder I., Lam K.S., Janus E.D. (1995). Changes in serum lipoprotein(a) and lipids during treatment of hyperthyroidism; *Clin. Chem.*, 41, 226-231.

Kurokawa M., Hirano T., Furukawa S., Bagano S., Adachi M. (1995). Similar to oleic acid, eicosapentaenoic acid stimulates apolipoproteinB secretion by inhibiting its intracellular degradation in HepG2 cells. *Atherosclerosis*, 112, 59-68.

Kwon H.Y., Butltman S.J., Löffler C., Chen W.J., Furdon P.J., Powel J.G., Usala A.L., Wilkinson W., Hansmann I., Woychik R.P. (1994). Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the agouti gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 9760-9764.

Lackner K.J., Law S.W., Brewer H.B., Sakagushi A., Naylor S.L. (1984). The human apolipoprotein A-II gene is located on chromosome 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 877-883.

Ladias J.A.A., Hadzopoulou-Cladaras M., Kardassis D., Cardot P., Cheng J., Zannis V., Cladaras C. (1992). Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes apo B, apo C-III and apo A-II by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. *J. Biol. Chem.*, 267, 15849-15860.

Lagocki P.A., Scanu A.M. (1980). In vitro modulation of the apolipoprotein composition of high density lipoprotein by apolipoprotein A-II. *J. Biol. Chem.*, 255, 3701-3706.

Lambert P.D. (1993). A role for neuropeptide Y, dynorphin, and noradrenaline in the central control of food intake after food deprivation. *Endocrinology*, 133, 29-32.

Larsson B., Björntorp P., Tibblin G. (1981). The health consequences of moderate obesity. *Int. J. Obes.*, 5, 97.

Lee J.W., Ryan F., Swaffield J., Johnston S.A., Moore D. (1995b). Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature*, 374, 91-94.

Lee S.S.T., Pineau T., Drago J., Lee E.J., Owens J.W., Kroetz D.L., Fernandez-Salguero P.M., Westphal H., Gonzales F.J. (1995). Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome

proliferator activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 3012-3022.

Lehmann J.M., Moore L.B., Smith-Oliver T.A., Wilkison W.O., Willson T.M., Kliewer S.A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). *J. Biol. Chem.*, 270, 12953-12956.

Leibowitz S.F. (1991). Neurochemical control of macronutrient intake. In : Oomura T. et al., eds. *Progress in obesity research 1990*. London : John Libbey & Co.

Leibowitz S.F. (1992). Brain neurotransmitters and hormones in relation to eating behavior and its disorders. In Björntorp P., Brodoff B.N., eds. *Obesity*. Philadelphia : J.B. Lippincott, 184-205.

Leibowitz S.F., Brown L.L. (1980). Histochemical and pharmacological analysis of catecholaminergic projections to the perifornical hypothalamus in relation feeding inhibition. *Brain Res.*, 201, 315-345.

Leibowitz S.F., Myers R.D. (1987). The neurochemistry of ingestion : chemical stimulation of the brain and in vivo measurement of transmitter release. In : Toates F.M., Rowland N.E., eds. *Feeding and drinking*. Amsterdam : Elsevier Science Publishers, 271-315.

Leibowitz S.F., Shor-Posner. (1986). Hypothalamic monoamine systems for control of food control of food intake : analysis of meal patterns and macronutrient selection. In : Carruba M.O., Blundell J.E., eds. *Pharmacology of eating disorders : theoretical and clinical developments*. New York : Raven Press, 29-50.

Lemberger T., Staels B., Saladin R., Desvergne B., Auwerx J., Wahli W. (1994). Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.*, 269, 24527-24530.

Leroy A., Dallongeville J., Fruchart J.C. (1995). Apolipoprotein A-I containing lipoproteins and atherosclerosis. *Curr. Op. Lipid.*, 6, 281-285.

Levitsky D.A. (1970). Feedings patterns of rats in response to fast and changes in environmental conditions. *Physiol. Behav.*, 5, 291-300.

Levitsky D.A., Faust I., Glassman M. (1976). The ingestion of food and the recovery of body weight following in the naive rat. *17*, 575-580.

Lieber C.S. (1991). Perspectives : do alcohol calories count ?. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54, 976-982.

Lin R.C. (1988). Effects of hormones on apolipoprotein secretion in cultured rat hepatocytes. *Metabolism*, 37, 745-751.

Lin-Lee Y.C., Strobl W., Soyal S., Radosavjevic M., Song M., Gotto A.M., Patsch W. (1993). Role of thyroid hormone in the expression of apolipoprotein A-IV and C-III gene in rat liver. *J. Lipid Res.*, 34, 249-259.

Linga V., Leight M.A., Curtiss L.K., Marcel Y.L., St Clair R.V., Parks J.S. (1994). Dietary fish oil-induced decrease in low density lipoprotein binding to fibroblast is mediated by apolipoprotein E. *J. Lipid Res.*, 35, 491-500.

Lönnqvist F., Arner P., Nordior L., Schalling M. (1995). Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nature Medecine*, 2, 950-953.

Lönnroth P., Smith U. (1992). Intermediary metabolism with an emphasis on lipid metabolism, adipose tissue, and fat cell metabolism : a review. In Björntorp P., Brodoff B.N. (1992). *Obesity*. J.B. Lippincott Company, 3-14.

Love J.M., Gudas L.J. (1994). Vitamine A, differentiation and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6, 825-831.

Lu D., Willard D., Patel I.R., Kadwell S., Overton L., Kost T., Luther M., Chen W., Woychik R.P., Wilkinson W.O., Cone R.D. (1994). Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating hormone receptor. *Nature*, 371, 799-802.

Luc G., Lecerf J.M., Bard J.M., Hachulla E., Fruchart J.C., Devulder B. (1991). Cholestérol et Athérosclérose. Masson ed., Paris.

Luchoomun J., Demoer L., Tartar A., Rosseneu M., Denèfle P., Castro G.R., Fruchart J.C. (1993). A synthetic peptide that mimics properties of apo A-I. *Circulation*, 88, 2482.S

Maciekko J.J., Holmes D.R., Kottke B.A., Zimsmaister A.R., Dihm D.M., Mao S.J.T. (1983). Apolipoprotein A-I as a marker for angiographically assessed coronary artery disease. *New Engl. J. Med.*, 309, 385-389.

Maffei M., Fei H., Lee G.H., Dani C., Leroy P., Zhang Y., Proenca R., Negrel R., Alilaud G., Friedman J.M. (1995). Increased expression in adipocytes of ob mRNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 6957-6960.

Mahley R.W., Innerarity T.L., Rall S.C., Weisgraber K.H. (1984). Plasma lipoproteins : apolipoprotein structure and function. *J. Lipid. Res.*, 25, 1277-1294.

Malmendier C.L., Delcroix C. (1985). Effects of fenofibrate on high and low density lipoprotein metabolism in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 55, 161-169.

Mangeney M., Cardot P., Lyonnet S., Coup C., Benarous R., Munnich A., Girard J., Chambaz J., Bereziat G. (1989). Apolipoprotein E gene expression in rat liver during development in relation to insulin and glucagon. *Eur. J. Biochem.*, 181, 225-230.

Manne J., Argeson A.C., Siracusa L.D. (1995). Mechanisms for the pleiotropic effects of the agouti gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 4721-4724.

Maragandakis M.E., Hankin H. (1971). On the mode of action of lipid lowering agents. V. Kinetics of the inhibition in vitro of rat acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.*, 246, 348-354.

Martin L.F., Hunter S. MacD., Lauve R.M. and O'Leary J.P. (1995). Severe obesity : expensive to society, frustrating to treat, but important to confront. *Southern Med. J.*, 88, 895-902.

Martin-Sanz P., Vance J.E., Brindley D.N. (1990). Stimulation of apolipoprotein secretion in very-low-density and high-density lipoproteins from cultured rat hepatocytes by dexamethasone. *Biochem. J.*, 271, 575-583.

Masumoto A., Koga S., Uchida E., Ibayashi H. (1988). Effects of insulin, dexamethasone and glucagon on the production of apolipoprotein A-I in cultured rat hepatocytes. *Atherosclerosis*, 70, 217-223.

Masuzaki H., Ogawa Y., Isse N., Satoh N., Okazaki T., Shigemoto M., Mori K., Tamura N., Hosoda K., Yoshimasa Y., Jingami H., Kawada T., Nakao K. (1995). Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes*, 44, 855-858.

Mathe D., Serouge C., Ferezou J., Lecuyer B. (1991). Lipolytic activities in rats fed a sucrose-rich diet supplemented with either cystine or cholesterol : relationships with lipoprotein profiles. *Ann. Nutr. Metab.*, 35, 165-173.

Matsumoto A., Aburatani H., Shibasaki Y., Kodama T., Takaku F., Itakura H. (1987). Cloning and regulation of apolipoprotein B mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142, 92-99.

Mattson F.H., Grundy S.M. (1985). Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J. Lipid Res.*, 26, 194.

Mc Ginnis R., Walker J., Margules D. (1987). Genetically obese (ob/ob) mice are hypersensitive to glucocorticoid stimulation of feeding but dramatically resist glucocorticoid-induced weight loss. *Life Sci.*, 40, 1561-1570.

McGowan M.K., Andrews K.M., Grossman S.P. (1990). Effects of chronic intrahypothalamic infusion of insulin on food intake and diurnal meal patterning in the rat. *Behav Neurosci.*, 104, 371-381.

McGuirk J., Silverstone T. (1990). Effects of fluoxetine on appetite, food intake and body weight in obese subjects. *Int. J. Obes.*, 14(Suppl 2), 141.

Mehlum A., Staels B., Duverger N., Tailleux A., Castro G., Fievet C., Luc G., Fruchart J.C., Olivecrona G., Skretting G., Auwerx J., Prydz H. (1995). Tissue specific expression of the human gene for lecithin:cholesterol acyltransferase in transgenic mice alters blood lipids, lipoproteins and lipases towards a less atherogenic profile. *Eur. J. Biochem.*, 230, 567-575.

Mei N. (1985). Intestinal chemosensitivity. *Physiol Rev.*, 65, 211-237.

Mellies M.J., Stein E.A., Khoury P., Lamkin G., Glueck C.J. (1987). Effects of fenofibrate on lipids, lipoproteins and apolipoproteins in 33 subjects with primary hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*, 63, 57-64.

Melish J., Le N.A., Ginsberg H., Steinberg D., Brown W.V. (1980). Dissociation of apoprotein B and triglyceride production in very-low-density lipoproteins. *Am. J. Physiol.*, 239, E354-E362.

Mensink R.P., Katan M.B. (1987). Effect of monounsaturated fatty acids versus complex carbohydrates on high density lipoproteins in healthy men and women. *Lancet*, 1, 122-125.

Mensink R.P., De Groot M.J.M., Van den Broeke L.T., Severijnen-Nobels J.P., Demacker P.N.M., Katan M.B. (1989). Effects of monounsaturated fatty acids v complex carbohydrates on serum lipoproteins and apolipoproteins in healthy men and women. *Metabolism*, 38, 172-178.

Michaud E.J., Butltman S.J., Klebig M.L., Van Vugt M.J., Stubb L.J., Russel L.B., Woychik R.P. (1994). A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (AY) mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 2562-2566.

Mickelsen O., Takahashi S., Craig C. (1955). Experimental obesity : Production of obesity in rats by feeding high-fat-diets. *J. Nutr.*, 57, 541-554.

Miller M.W., Duhl D.M.J., Vrieling H., Cordes S.P., Ollmann M.M., Winkes B.M., Barsh G.S. (1993). Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expresed in mice carrying the lethal yellow mutation. *Genes and Development*, 7, 454-467.

Miller N.E., Forde O.H., Thelle D.S. (1977). High-density lipoprotein and coronary heart disease : A prospective case-control study. *Lancet*, 1, 965-.

Mitamura T. (1987). Glucocorticoid-induced elevation of serum high-density lipoprotein-cholesterol and its reversal bt adrenocorticotropin in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 917, 121-130.

Mitchell A., Fidge N., Griffiths P. (1993). The effect of HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin and of cholestyramine on hepatic apolipoprotein mRNA levels in the rat. *Biochem. Biophys. Acta*, 1167, 9-14.

Miura S., Iitaka M., Yoshimura H., Kitahama S., Fukasawa N., Kawakami Y., Sakurai S., Urabe M., Sakatsume Y., Ito K. (1994). Disturbed lipid metabolism in patients with subclinical hypothyroidism : effect of L-thyroxine therapy. *Intern. Med.*, 33, 413-417.

Moberly J.B., Cole T.G., Alpers D.H., Schonfeld G. (1990). Oleic acid stimulation of apolipoprotein B secretion from Hep G2 and Caco-2 cells occurs post-transcriptionally. *Biochem. Biophys. Acta*, 1042, 70-80.

Modan M., Halkin H., Lusky A. (1988). Hyperinsulinemia is characterized by jointly disturbed plasma VLDL, LDL and HDL levels. *Arteriosclerosis*, 8, 227-236.

Monk J.P., Todd P.A. (1987). Bezafibrate : a review. *Drugs*, 33, 539-576.

Murakami T., Shima K. (1995a). Cloning of rat obese cDNA and its expression in obese rats. Biochem. Biophys. Res. Comm., 209, 944-952.

Murakami T., Iida M., Shima K. (1995b). Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 214, 1260-1267.

Murthy S., Albright E., Mathur S.N., Davidson N.O., Field F.J. (1992). Apolipoprotein B mRNA abundance is decreased by eicosapentaenoic acid in CaCo-2 cells (Effect of synthesis and secretion of apolipoprotein B). Arteriosclerosis and Thrombosis, 12, 691-700.

Nagashima M., Morris G., Howlett G., Fidge N., Schreiber G. (1986). Amino acid sequence of rat apolipoprotein A-II deduced from the nucleotide sequence of cloned cDNA. J. Lipid Res., 27, 706-712.

Naggert J.K., Fricker L.D., Varlamov O., Nishina P.M., Rouille Y., Steiner D.F., Caroll R.J., Paigen B.J., Leiter E.H. (1995). Hyperproinsulinemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. Nature Genetics, 10, 135-142.

Nashel D.J. (1986). Is atherosclerosis a complication of long-term corticosteroid treatment ? Am. J. Med., 80, 925-929.

Ogawa Y., Masuzaki H., Isse N., Okazaki T., Mori K., Shigemoto M., Satoh N., Tamura N., Hosoda K., Yoshimasa Y., Jingami H., Kawada T., Nakao K. (1995). Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. J. Clin. Invest., 96, 1647-1652.

Ogbonna G., Theriault A., Adeli K. (1993). Hormonal regulation of human apolipoprotein E gene expression in HepG2 cells. Int. J. Biochem., 25, 635-640.

Ohta T., Hattori S., Nishiyama S., Matsuda I. (1988). Studies on the lipid and apolipoprotein composition of two species of apo A-I containing lipoproteins in normolipidemic males and females. J. Lipid Res., 29, 721-728.

Oomura Y., Sasaki K., Hanai K.; (1991). Chemical and neuronal regulation of food intake. In : Oomura Y., Tarui S., Inoue S., Shimizu T., eds. Progress in obesity research 1990. London : John Libbey & Co., 3-12.

Oppert J.M., Tourville J., Chagnon M., Maurière P., Dionne F.T., Pérusse L., Bouchard C. (1995). DNA polymorphism in the  $\alpha$ -2 and  $\beta$ -2 adrenoreceptor genes and regional fat distribution in human : association and linkage studies. Obes. Res.,

Oppert J.M., Volh M.C., Chagnon M., Dionne F.T., Cassart-Doulcier A.M., Ricquier D., Pérusse L., Bouchard C. (1994). DNA polymorphism in the uncoupling protein (UCP) gene and human body fat. Int. J. Obes., 18, 526-531.

Oram J.F., Brinton E.A., Bierman E.L. (1983). Regulation of high density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts and human arterial smooth muscle cells. J. Clin. Invest., 72, 1611-1621.

Oram J.F., McKnight G.L., Hart C.E. (1990). The high density lipoprotein receptor. Arterioscler. Rev., 20, 103-107.

Osada J., Fernandez-Sanchez A., Diaz-Morillo J.L., Aylagas H., Miro-Obradors M.J., Ordovas J.M., Palacios-Alaiz E. (1991). Hepatic expression of apolipoprotein A-I gene in rats is upregulated by monounsaturated fatty acid diet. Biochem. Biophys. Res. Commun., 180, 162-168.

Osborne T.F., Goldstein J.L., Brown M.S. (1985). 5' end of HMG CoA reductase gene contains sequences responsible for cholesterol-mediated inhibition of transcription. Cell, 42, 203-212.

Oshima H., Simons S.S.J. (1992). Modulation of transcription factor activity by a distant steroid modulatory element. Mol. Endocrinol., 6, 416-428.

Oshima H., Szapary D., Simons S.S. (1995). The factor binding to the Glucocorticoid Modulatory Element of the Tyrosine Aminotransferase gene is a novel and ubiquitous heteromeric complex. *J. Biol. Chem.*, 270, 21893-21901.

Osumi T., Wen J.K., Hashimoto T. (1991). Two cis-acting regulatory elements in the peroxisome proliferator-responsive element enhancer region of the rat acyl-CoA oxidase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175, 866-871.

Paigen B.J., Coleman D.L. (1990). Linkage of fat to esterase-1. *Mouse Genome*, 86, 240.

Paszty C., Maeda N., Versuyft J., Rubin E.M. (1994). Apolipoprotein AI transgene mice corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J. Clin. Invest.*, 94, 899-903.

Parhofer K.G., Barrett P.H., Dunn J., Schonfeld G. (1993). Effect of pravastatin on metabolic parameters of apolipoprotein B in patients with mixed hyperlipoproteinemia. *Clin. Invest.*, 71, 939-946.

Peeples L.H., Carpenter J.W., Israel R.G. (1989). Alterations in low-density lipoproteins in subjects with abdominal adiposity. *Metabolism*, 38, 1029-.

Pelleymounter M.A., Cullen M.J., Baker M.B., Hecht R., Winters D., Boone T., Collins F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 269, 540-543.

Peret J., Macaire I., Chanez M. (1973). Schedule of protein ingestion, nitrogen and energy utilization and circadian rhythm of hepatic glycogen, plasma corticosterone and insulin in rats. *J. Nutr.*, 103, 866-874.

Perry W.L., Hustad C.M., Swing D.A., Jenkin N.A., Copeland N.G. (1995). A transgenic mouse assay for agouti protein activity. *Genetics*, 140, 267-274.

Philipson B.E., Rothrock D.R., Connor W.E., Harris W.S., Illingworth D.R. (1995). Reduction of plasma lipids, lipoproteins and apoproteins by dietary fish oils in patients with hypertriglyceridemia. *N. Eng. J. Med.*, 332, 1210-1216.

Pittet P., Chappuis P., Acheson K., De Techtermann F., Jéquier E. (1976). Thermic effect of glucose in obese subjects studied by direct and indirect calorimetry. *Br. J. Nutr.*, 35, 281-292.

Plump A.S., Scott C.J., Breslow J.L. (1994). Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 9607-9611.

Powley T.L., Berthoud H. (1986). Participation of the vagus and other autonomic nerves in the control of food intake. In Ritter R.C., Ritter S., Barnes C.D., eds. *Feeding behavior neural and humoral controls*. Orlando : Academic Press, 67-101.

Prentice A.M., Black A.E., Murgatroyd P.R., Goldberg G.R., Coward W.A. (1980). Metabolism on appetite : question of energy balance with particular reference to obesity. *J. Nutr. Diet.*, 2, 95-104.

Puchois P., Kandoussi A., Fievet C., Fourrier J.L., Bertrand M., Koren E., Fruchart J.C. (1987). Apolipoprotein A-I containing lipoproteins in coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 68, 35-40.

Pullinger C.R., North J.D., Teng B.B., Rifici V.A., Ronhild de Brito A.E., Scott J. (1989). The apolipoprotein B gene is constitutively expressed in Hep G2 cells : regulation of secretion by oleic acid, albumin, and insulin, and measurement of the mRNA half-life. *J. Lipid Res.*, 30, 1065-1077.

Punnonen R.H., Jokela H.A., Dastidar P.S., Navala M., Laippala P.J. (1995). Combined oestrogen-progestin replacement therapy prevents atherosclerosis in post-menopausal women. *Maturitas*, 21, 179-187.

Rader D.J., Castro G., Zech L.A., Fruchart J.C., Brewer Jr. H.B. (1991). In vivo metabolism of apolipoprotein A-I on high density lipoprotein particles LpAI and LpAI:AII. *J. Lipid Res.*, 32, 1849-1859.

Radosavljevic M., Lin-Lee Y.C., Soyal S.M., Strobl W., Seelos C., Gotto A.M., Patsch W. (1992). Effect of sucrose diet on expression of apolipoprotein genes A-I, C-III and A-IV in rat liver. *Atherosclerosis*, 95, 147-156.

Ramirez I., Friedman M.I. (1990). Dietary hyperphagia in rats : role of fat, carbohydrate and energy content. *Physiol Behav.*, 47, 1157-1163.

Ravussin E., Lillioja S., Anderson T.E., Christin L., Bogardus C. (1986). Determinants of 24-hour energy expenditure in man : methods and results using a respiratory chamber. *J. Clin. Invest.*, 78, 1568-1578.

Ravussin E., Lillioja S., Knowler W.C. (1988). Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body weight gain. *N. Engl. J. Med.*, 318, 467-472.

Reaven G.M., Hill D.B., Gross R.C., Farquhar J.W. (1965). Kinetics of triglyceride turnover of very low density lipoproteins of human plasma. *J. Clin. Invest.*, 44, 1826-1833.

Rentsch J., Levens N., Chiesi M. (1995). Recombinant ob-gene product reduces food intake in fasted mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 214, 131-136.

Ribeiro A., Mangeney M., Cardot P., Loriette C., Chambaz J., Rayssiguier Y., Bereziat G. (1992). Régulation nutritionnelle des gènes des apolipoprotéines. (Effet des hydrates de carbone et des acides gras alimentaires). *Diabète Métab.*, 18, 137-144.

Ribeiro A., Mangeney M., Cardot P., Loriette C., Rayssiguier Y., Chambaz J., Bereziat G. (1991). Effect of dietary fish oil and corn oil on lipid metabolism and apolipoprotein gene expression by rat liver. *Eur. J. Biochem.*, 196, 499-507.

Rifici V.A., Eder H.A. (1984). A hepatocyte receptor for high density lipoproteins specific for apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.*, 259, 13814-13818.

Rink T.J. (1994). In search of a satiety factor. *Nature*, 372, 406-407.

Rolls B.J. (1979). How variety and palatability can stimulate appetite. *Nutr. Bul.*, 5, 78-86.

Romieu I., Willett W.C., Stampfer M.J. (1988). Energy intake and other determinants of relative weight. *Am. J. Clin. Nutr.*, 47, 406-412.

Romney J.S., Chan J., Carr F.E., Mooradian A.D., Wong N.C.W. (1992). Identification of the thyroid hormone-responsive messenger RNA Spot 11 as apolipoprotein A-I messenger RNA and effects of the hormone on the promoter. *Mol. Endo.*, 6, 943-950.

Rothblat G.H., Mahlberg F.H., Johnson W.J., Phillips M.C. (1992). Apolipoprotein, membrane cholesterol domains and the regulation of cholesterol efflux. *J. Lipid Res.*, 33, 1091-1097.

Rothwell N.J., Stock M.J. (1979). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature*, 281, 31-35.

Rottman J.N., Widom R.L., Nadal-Ginard B., Mahdavi V., Karathanasis S.K. (1991). A retinoic acid responsive element in the apolipoprotein A-I gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 3814-3820.

Rubin E.M., Krauss R.M., Spangler E.A., Verstuyft J.G., Clift S.M. (1991). Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein A-I. *Nature*, 353, 265-267.

Ruderman N.B., Jones A.L., Krauss R.M., Shafrir E. (1971). A biochemical and morphologic study of very low density lipoproteins in carbohydrates-induced hypertriglyceridemia. *J. Clin. INvest.*, 50, 1355-1368.

Rudling M., Angelin B. (1993). Stimulation of rat hepatic low density lipoprotein receptors by glucagon. Evidence of a novel regulatory mechanism in vivo. *J. Clin. Invest.*, 91, 2796-2805.

Salam W.H., Wilcox H.G., Heimberg M. (1988). Effects of oleic acid on the biosynthesis of lipoprotein apoproteins and distribution into the very-low-density lipoprotein by the isolated perfused rat liver. *Biochem. J.*, 251, 809-816.

Salter A.M., Fisher S.C., Brindley D.N. (1987). Binding of low density lipoprotein to monolayer cultures of rat hepatocytes is increased by insulin and decreased by dexamethasone. *FEBS Lett.*, 220, 159-162.

Sato R., Yang J., Wang X., Evans M.J., Ho Y.K., Goldstein J.L., Brown M.S. (1994). Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1). *J. Biol. Chem.*, 269, 17267-17273.

Schoonjans K., Staels B., Deeb S., Auwerx J. (1995). Fibrates and fatty acids induce lipoprotein lipase gene expression via the peroxisome proliferator activated receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, submitted.

Schoonjans K., Watanabe M., Suzuki H., Mahfoudi A., Krey G., Wahli W., Grimaldi P., Staels B., Yamamoto T., Auwerx J. (1995). Identification of a peroxisome proliferator response element in the C promoter of the acyl-Coenzyme A synthetase gene. *J. Biol. Chem.*, in press.

Schroeder F., Jefferson J.F., Kier A.B., Knittel J., Scallen T.J., Wood W.G., Happala I. (1991). Membrane cholesterol dynamics : cholesterol domains and kinetic pools. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 195, 235-252.

Schultz J.R., Verstuyft J.G., Gong E.L., Nichols A.V., Rubin E.M. (1993). Protein composition determines the antiatherogenic properties of HDL in transgenic mice. *Nature*, 365, 762-764.

Sclafani A. (1987). Carbohydrate-induced hyperphagia and obesity in the rat : effects of saccharide type, form and taste. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 11, 155-162.

Scott J., Navaratman N., Bhattacharya S., Morrison J. (1994). The apolipoprotein B messenger editing enzyme. *Curr. Opin. Lipid.*, 5, 87-93.

Seidell J.C. (1995). Obesity in Europe : scaling an epidemic. *Int. J. Obes.*, 19, S1-S4.

Seishima M., Bisgaier C.L., Davies S.L., Glickman R.M. (1991). Regulation of hepatic apolipoprotein synthesis in the 17 $\alpha$ -ethynodiol treated rat. *J. Lipid Res.*, 32, 941-951.

Sheng H.P., Huggins R.A. (1979). A review of body composition studies with emphasis on total body water and fat. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32, 630-647.

Shepherd J., Caslake M., Lorimer A.R., Vallance B.D., Packard C.J. (1985). Fenofibrate reduces low density lipoprotein catabolism in hypertriglyceridemic subjects. *Arteriosclerosis*, 5, 162-168.

Shih H.M., Towle H.C. (1992). Definition of the carbohydrate response element of the rat S14 gene. Evidence for a common factor required for carbohydrate regulation of hepatic genes. *J. Biol. Chem.*, 267, 13222-13228.

Sikand G., Kondo A., Foreyt J.P., Jones P.H., Gotto A.M. (1988). Two years follow-up patients treated with very low caloric dieting and exercise testing. *J. Dietet. Assoc.*, 88, 487-488.

Silverstone J.T., Turner P., Humpherson P.L. (1968). Direct measurement of the anorectic activity of diethylpropion (Tenuate Dospan). *J. Clin. Pharmacol.*, 8(Suppl 3), 172-179.

Silverstone T. (1972). The anorectic effect of a long-acting preparation of phentermine (Duromine). *Psycho-pharmacologia*, 25, 315-320.

Silverstone T., Kyriakides M. (1982). Clinical pharmacology of appetite. In : Silverstone T., eds. *Drugs and appetite*. London : Academic press, 93-123.

Smith G.P., Jerome C., Norgren R. (1985). Afferent axons in abdominal vagus mediate satiety effect of cholecystokinin in rats. *Am. J. Physiol.*, 249, R638-R641.

Smith J.R., Osborne T.F., Brown M.S., Goldstein J.L., Gil G. (1988). Multiple sterol regulatory elements in promoter for hamster. *J. Biol. Chem.*, 263, 18480-18487.

Smith J.R., Osborne T.F., Goldstein J.L., Brown M.S. (1990). Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.*, 265, 2306-2310.

Snyder W.S., Cook M.J., Nasset E.S., Karhausen L.R., Howells G.P., Tipton I.H. (1974). Report of the task group on reference man. The international Commission on Radiological Protection, no 23. New York Pergamon Press.

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

Sorci-Thomas M., Wilson M.D., Johnson F.L., Williams D.L., Rudel L.L. (1989). Studies on the expression of genes encoding apolipoproteins B100 and B48 and the low density lipoprotein receptor in non human primate. Comparison of dietary fat and cholesterol. *J. Biol. Chem.*, 264, 9039-9045.

Sorensen H.N., Hvattum E., Paulsen E.J., Gautvik K.M., Bremer J., Spydevold O. (1993). Induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase by 3-thia fatty acid, in hepatoma cells and hepatocytes in culture is modified by dexamethasone and insulin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1171, 263-271.

Sorensen T.I.A., Holst C., Stunkard A.J., Skovgaard. (1992). Correlations of body mass index of adult adoptees and their biological and adoptive relatives. *Int. J. Obes.*, 16(3), 227-236.

Soutar A.K., Garner C.W., Baker H.N., Sparrow J.T., Jackson R.L., Gotto A.M., Smith L.C. (1975). Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*, 14, 3057-3063.

Soyal S.M., Seelos C., Lin-Lee Y.C., Sanders S., Gotto A.M.Jr., Hachey D.L., Patsch W. (1995). Thyroid hormone influences the maturation of apolipoprotein A-I messenger in rat liver. *J. Biol. Chem.*, 270, 3996-4004.

Sparks C.E., Sparks J.D., Bolognino M., Salhanick A., Strumph P.S., Amatruda J.M. (1986). Insulin effects on apolipoprotein B lipoprotein synthesis and secretion by primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism*, 35, 1128-1136.

Sparks J.D., Sparks C.E. (1990). Insulin modulation of hepatic synthesis and secretion of apolipoprotein B in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 265, 8854-8862.

Sparks J.D., Zolfaghari R., Sparks C.E., Smith H.C., Fisher E.A. (1992). Impaired hepatic apolipoprotein B and E translation in streptozotocin diabetic rats. *J. Clin. Invest.*, 89, 1418-1430.

Srivastava R.A.K. (1995). Increased apo B100 in inbred strains of mice by estrogen is caused by decreased RNA editing protein mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212, 381-387.

Srivastava R.A.K., Jiao S., Tang J., Pfleger B.A., Kitchens R.T., Schonfeld G. (1991). In vivo regulation of low-density lipoprotein receptor and apolipoprotein B gene expression by dietary fat and cholesterol in inbred strains of mice. *Biochem. Biophys. Acta*, 1086, 29-43.

Srivastava R.A.K., Kitchens R.T., Schonfeld G. (1994). Regulation of the apolipoprotein A-IV gene expression by estrogen differs in rat and mouse. *Eur. J. Biochem.*, 222, 507-514.

Srivastava R.A.K., Tang J., Baumann D., Schonfeld G. (1992b). Hormonal and nutritional stimuli modulate apolipoprotein B mRNA editing in mouse liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 188, 135-141.

Srivastava R.A.K., Tang J., Krul E.S., Pfleger B., Kitchens R.T., Schonfeld G. (1992a). Dietary fatty acids and dietary cholesterol differ in their effect on the in vivo regulation of apolipoprotein A-I and A-II gene expression in inbred strains of mice. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1125, 251-261.

Srivastava R.A., Baumann D., Schonfeld G. (1993). In vivo regulation of low density lipoprotein receptors by estrogen differs at the post-transcriptional level in rat and mouse. *Eur. J. Biochem.*, 216, 527-538.

Staels B., Auwerx J., Chan L., Van Tol A., Rosseneu M., Verhoeven G. (1989). Influence of development, estrogens, and food intake on apolipoprotein A-I, A-II et E mRNA in rat liver and intestine. *J. Lipid Res.*, 30, 1137-1145.

Staels B., Van Tol A., Andreu T., Auwerx J. (1992). Fibrates influence the expression of genes involved in lipoprotein metabolism in a tissue selective manner. *Arterio. Thrombo.*, 12, 286-294.

Staels B., Van Tol A., Chan L., Verhoeven G., Auwerx J. (1991). Variable effect of different corticosteroids on plasma lipids, apolipoproteins, and hepatic apolipoprotein mRNA levels in rats. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 11, 760-769.

Staels B., Van Tol A., Chan L., Will H., Verhoeven G., Auwerx J. (1990a). Alterations in thyroid status modulate apolipoprotein, hepatic triglyceride lipase, and low density lipoprotein receptor in rats. *Endocrinology*, 127, 1144-1152.

Staels B., Van Tol A., Verhoeven G., Auwerx J. (1990b). Apolipoprotein A-IV messenger ribonucleic acid abundance is regulated in a tissue-specific manner. *Endocrinology*, 126, 2153-2163.

Staels B., Jansen H., Van Tol A., Stahnke G., Will H., Verhoeven G., Auwerx J. (1990c). Development, food intake, and ethinylestradiol influence hepatic triglyceride lipase and LDL-receptor mRNA levels in rats. *J. Lipid Res.*, 31, 1211-1218.

Staels B., Auwerx J. (1992). Perturbation of developmental gene expression in rat liver by fibratric acid derivatives; lipoprotein lipase and  $\alpha$ -fetoprotein as models. *Development*, 115, 1035-1043.

Staels B., Vu Dac N., Kosykh V., Saladin R., Fruchart J.C., Dallongeville J., Auwerx J. (1995). Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase (A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates). *J. Clin. Invest.*, 95, 705-712.

Stahlberg D., Reihner E., Ewerth S., Einarsson K., Angelin B. (1991). Effects of bezafibrate on hepatic cholesterol metabolism. *J. Eur. Clin. Pharmacol.*, 40, S33-S36.

Stephens T.W., Basinski M., Bristow P.K., Bue-Valleskey J.M., Burgett S.G., Craft L., Hale J., Hoffmann J., Hsiung H.M., Kriauciunas A., MacKellar W., Rosteck P.R., Schoner B., Smith D., Tinsley F.C., Zhang X.Y., Helman M. (1995). The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*, 377, 530-532.

Stralfors P., Björzell P., Belfrage P. (1984). Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes : identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 3317.

Stirling B., Cox N.J., Bell G.I., Hanis C.L., Spielman R.S., Concannon P. (1995). Identification of microsatellite markers near the human ob gene and linkage studies in NIDDM-affected sib pairs. *Diabetes*, 44 : 999-1001.

Strobl W., Chan L., Patsch W. (1992). Differential regulation of hepatic apolipoprotein A-I and A-II gene expression by thyroid hormone in rat liver. *Atherosclerosis*, 97, 161-170.

Strobl W., Gorder N.L., Fienup G.A., Lin-Lee Y.C., Gotto A.M., Patsch W. (1989). Effect of sucrose diet on apolipoprotein biosynthesis in rat liver. (increase in apolipoprotein E gene transcription). *J. Biol. Chem.*, 264, 1190-1194.

Strobl W., Gorder N.L., Lin-Lee Y.C., Gotto A.M., Patsch W. (1990). Role of thyroid hormones in apolipoprotein A-I gene expression in rat liver. *J. Clin. Invest.*, 85, 659-667.

Stuart R.B. (1967). Behavioral control of overeating. *Behav. Res. Ther.*, 5, 357-365.

Stucchi A.F., Hennessy L.K., Vespa D.B., Weiner E.J., Osada J., Ordovas J.M., Schaefer E.J., Nicolosi R.J. (1991). Effect of corn and coconut oil-containing diets with and without cholesterol on high density lipoprotein apoprotein A-I metabolism and hepatic apoprotein A-I mRNA levels in Cebus monkeys. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 11, 1719-1729.

Südhof T.C., Van der Westhuyzen D.R., Goldstein J.L., Brown M.S., Russell D., (1987). Three direct repeats and a TATA-like sequence are required for regulated expression of the human low density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.*, 262, 10773-10779.

Sultan F., Benhizia F., Lagrange D., Will H., Griglio S. (1995). Effect of dietary cholesterol on activity and mRNA levels of hepatic lipase in rat. *Life Sci.*, 56, 31-37.

Tall A.R., Small D.M. (1978). Plasma high density lipoproteins. *N. Engl. J. Med.*, 299, 1232-1236.

Tam S.P., Archer T.K., Deeley R.G. (1985). Effects of estrogen on apolipoprotein secretion by the human hepatocarcinoma cell line, HepG2. *J. Biol. Chem.*, 260, 1670-1675.

Tam S.P., Ramharack R. (1992). The effect of 25-hydroxycholesterol on the regulation of apolipoprotein E mRNA levels and secretion in the human hepatoma Hep G2. *Atherosclerosis*, 95, 137-146.

Tang J., Krul E.S., Schonfeld G. (1992). In vivo regulation of apolipoprotein A-I gene expression by estradiol and testosterone occurs at the translational level in inbred strains of brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181, 1407-1411.

Tang J., Srivastava R.A.K., Krul E.S., Baumann D., Pfleger B.A., Kitchens R.T., Schonfeld G. (1992). In vivo regulation of apolipoprotein A-I gene expression by estradiol and testosterone occurs by different mechanisms in inbred strains of mice. *J. Lipid Res.*, 32, 1571-1585.

Tartaglia L.A., Dembski M., Weng X., Deng N., Culpepper J., Devos R., Richards G.J., Campfield L.A., Clark F.T., Deeds J., Muir C., Sanker S., Moriarty A., Moore K.J., Smutko J.S., Mays G.G., Woolf E.A., Monroe C.A., Tepper R.I. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, .

Thériault A., Cheung R., Adeli K. (1992b). Expression of apolipoprotein B in vitro in cell-free lysates of Hep G2 cells : evidence that insulin modulates apo B synthesis at the translational level. *Clin. Biochem.*, 25, 321-323.

Thériault A., Ogbonna G., Adeli K. (1992a). Thyroid hormone modulates apolipoprotein B gene expression in HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 186, 617-623.

Thorngate F.E., Raghuram R., Wilcox H.G., Werner C.S., Heimberg M., Elam M.B. (1994). Insulin promotes the biosynthesis and secretion of apolipoprotein B-48 by altering apolipoprotein B mRNA editing. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 5392-5396.

Tontonoz P., Hu E., Graves R.A., Budavari A.I., Spiegelman B.M. (1994). mPPAR $\gamma$ 2 : tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.*, 8, 1224-1234.

Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B.M. (1995). Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ . *Curr. Opin. Gen. Develop.*, 5, 571-576.

Tozuka M., Fidge N.H. (1989). Purification and characterization of two high density lipoprotein binding proteins from a rat and human liver. *Biochem. J.*, 261, 239-244.

Trayhurn P., Thomas M.E.A., Duncan J.S., Rayner D.V. (1995). Effect of fasting and refeeding on ob gene expression in white adipose tissue of lean and obese (ob/ob) mice. *FEBS Letters*, 368, 488-490.

Truett G.E., Bahary N., Friedman J.M., Liebel R.L. (1991). Rat obesity gene fatty (fa) maps to chromosome 5 : Evidence for homology with the mouse gene diabete (db). Proc. Natl. Acad. Sci., 88, 7806-7809.

Tugwood J.D., Isseman I., Anderson R.G., Bundell K.R., McPheat W.L., Green S. (1992). The mouse peroxisome-proliferator-activated receptor recognizes a response element in the 5'flanking sequence of the rat acyl-CoA oxidase gene. EMBO J., 11, 433-439.

Turton M.D., O'Shea D., Beak S.A., Edwards C.M.B., Meeran K., Chol S.J., Taylor G.M., Heath M.M., Lambert P.D., Wilding J.P.H., Smith D.M., Ghatei M.A., Herbert J., Bloom S.R. (1995). A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. Nature, 379, 69-72.

Uchida E., Masumoto A., Sakamoto S., Koga S., Nawata H. (1991). Effect of insulin, glucagon or dexamethasone on the production of apolipoprotein A-IV in cultured rat hepatocytes. Atherosclerosis, 87, 195-202.

Vadiveloo P.K., Allan N.H., Murray B.J., Fidge N.H. (1993). Interaction of apolipoprotein A-II with the putative high density lipoprotein receptor. Biochem., 261, 239-244.

Valley V., Grace D.M. (1987). Psychosocial risk factors in gastric surgery for obesity : identifying guidelines for screening. Int. J. Obes., 11, 105-113.

Van Tol A., Jansen E.H.J.M., Koomans H.A., Joyles J.A. (1991). Hyperlipoproteinemia in Nagase analbumenic rats : effects of pravastatin on plasma (apo)lipoprotein and lecithin:cholesterol acyl transferase activity. J. Lipid Res., 32, 1719-1728.

Vanderbrouck Y., Janvier B., Loriette C., Bereziat G., Mangeney-Andreani M. (1994). The modulation of apolipoprotein E gene expression by 3;3'-5-triiodothyronine in Hep G2 cells occurs at the transcriptional and post transcriptional levels. Eur. J. Biochem., 224, 463-471.

Vanderbrouck Y., Janvier B., Loriette C., Bereziat G., Mangeney-Andreani M. (1995). Thyroid hormone modulates apolipoprotein A-I gene expression at the post-transcriptional level in Hep G2 cells. Eur. J. Biochem., 231, 126-132.

Varma V.K., Smith T.K., Sorci-Thomas M., Ettinger W.H. (1992). Dexamethasone increases apolipoprotein A-I concentrations in medium and apolipoprotein A-I mRNA abundance from HepG2 cells. Metabolism, 41, 1075-1080.

Vertes V., Genuth S.M., Hazelton I.M. (1977). Supplemented fasting as a large scale outpatient program. JAMA, 238, 1251-1253.

Vu Dac N., Schoonjans K., Kosykh V., Dallongeville J., Fruchart J.C., Staels B., Auwerx J. (1995). Fibrates increase human apolipoprotein A-II through activation of the peroxisome-proliferator activated receptor. J. Clin. Invest., 96, 741-750.

Vu Dac N., Schoonjans K., Laine B., Fruchart J.C., Auwerx J., Staels B. (1994). Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome-proliferator activated receptor with its response element. J. Biol. Chem., 269, 31012-31018.

Wahli W., Braissant O., Desvergne B. (1995). Peroxisome proliferator activated receptors : transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. Chem. Biol., 2, 261-266.

Walker M. (1995). Obesity, Insulin resistance, and its link to non-insulino-dependent diabetes mellitus. Metabolism, 44, 18-20.

Walsh B.W., Sacks F.M. (1994). Effects of postmenopausal hormone replacement with oral and transdermal estrogen on high density lipoprotein metabolism. J. Lipid Res., 35, 2083-2093.

- Wang H., Chen X., Fisher E.A. (1993). N-3 fatty acids stimulate intracellular degradation of apoprotein B in rat hepatocytes. *J. Clin. Invest.*, 91, 1380-1389.
- Warden C.H., Fisler J.S., Shoemaker S.M., Wen P.Z., Sevenson K.L., Pace M.J., Lusis A.J. (1995). Identification of four chromosomal loci determining obesity in a multifactorial mouse model. *J. Clin. Invest.*, 95, 1545-1552.
- Warden C.H., Hedrick C.C., Qiao J.H., Castellani L.W., Lusis A.J. (1993). Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A-II. *Science*, 261, 469-472.
- Watson J., Silver K., Boggardus C., Knowler W.C., Celi F.S., Austin S., Manning B., Strosberg A.D., Stern M.P., Raben N., Sorkin J.D., Roth J., Shuldiner A.R. (1995). Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the  $\beta$ 3-adrenergic-receptor gene. *New Engl. J. Med.*, 333, 343-347.
- Weigle D.S., Bukowski T.R., Foster D.C., Holderman S., Kramer J.M., Lasser G., Lofton-Day C.E., Prunkard D.E., Raymond C., Kuijper J.L. (1995). Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J. Clin. Invest.*, 96, 2065-2070.
- Weintraub M., Sriwatanakul K., Sundaresan P.R., Weis O.F., Dorn M. (1983). Extended release fenfluramine : patient acceptance and efficacy of evening dose. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 33, 621-627.
- Weintraub M.S., Zechner R., Brown A., Eisenberg S., Breslow J.L. (1988). Dietary polyunsaturated fats of the W-6 and W-3 series reduce postprandial lipoproteins levels. *J. Clin. Invest.*, 82, 1884-1893.
- Wellman P.J. (1990). A review of the physiological bases of the anorectic action of phenylpropanolamine (d,l-norephedrine). *Neurosci Biobehav. Rev.*, 14, 339-355.
- West D.B., Goudey-Lefevre J., York B., Truett G.E. (1994b). Dietary obesity linked to genetic loci on chromosomes 9 and 15 in a polygenic mouse model. *J. Clin. Invest.*, 94, 1410-1416.
- West D.B., Waguespack J., York B., Goudey-Lefevre J., Price R.A. (1994a). Genetic of dietary obesity in AKR/J \* SWR/J mice : segregation of the trait and identification of a linked locus on chromosome 4. *Mammalian Genome*, 5, 546-552.
- Widen E., Lehto M., Kanninen T., Waltson J., Shuldiner A.R., Groop L.C. (1995). Association of a polymorphism in the  $\beta$ 3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *New Engl. J. Med.*, 333, 348-351.
- Widom R.L., Rhee M., Karathanasis S.K. (1992). Repression by ARP-1 sensitizes apolipoprotein A-I gene responsiveness to RXR $\alpha$  and retinoic acid. *Mol. Cell. Bio.*, 12, 3380-3389.
- Wiklund O., Witztum J.L., Carew T.E., Pittman R.C., Elam R.L., Steinberg D. (1987). Turnover and tissues sites of degradation of glucosylated low density lipoprotein in normal and immunized rabbits. *J. Lipid Res.*, 28, 1098-1109.
- Wilson B.D., Ollmann M.M., Kang L., Stoffel M., Bell G.I., Barsh G.S. (1995). Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene. *Hum. Mol. Gen.*, 4, 223-230.
- Windler E.E.T., Kovanen P.T., Chao Y.S., Brown M.S., Havel R.J., Goldstein J.L. (1980). The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. A binding site that mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E. *J. Biol. Chem.*, 255, 10464-10471.
- Wiseman S.A., Powell J.T., Humphries S.E., Press M. (1993). The magnitude of the hypercholesterolemia of hypothyroidism is associated with variation in the low density lipoprotein gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 108-112.
- Wolfe B.M., Huff M.W. (1995). Effects of continuous low-dosage hormonal replacement therapy on lipoprotein metabolism in postmenopausal women. *Metabolism*, 44, 410-417.



Wong S.H., Fisher E.A., Marsh J.B. (1989). Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on apoprotein B mRNA and secretion of very low density lipoprotein in HepG2 cells. *Arteriosclerosis*, 9, 836-841.

Wu A.L., Windmueller H.G. (1979). Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in rat. *J. Biol. Chem.*, 254, 7316-7322.

Yokohama S., Fukushima D., Kupferberg J.P., Kezdy F.J., Kaiser E.T. (1980). The mechanism of activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by apolipoprotein A-I and an amphiphilic peptide. *J. Biol. Chem.*, 255, 7333-7339.

Zannis V.I., Karathanasis S.K., Keutmann H., Goldberger G., Breslow J.L. (1983). Intracellular and extracellular processing of human apo A-I. Secreted apo A-I isoprotein is a propeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 2574-2578.

Zelewski M., Swierczynski J. (1990). Comparative studies on lipogenic enzyme activities in the liver of human and some animal species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95, 469-472.

Zemel M.B., Han Kim J., Woychik, Michaud E.J., Kadwell S.H., Patel I.R., Wilkinson W.O. (1995). Agouti regulation of intracellular calcium : role in the insulin resistance of viable yellow mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 4733-4737.

Zhang B., Marcus S.L., Miyata K.S., Subramani S., Capone J.P., Rachubinski R.A. (1993). Characterization of protein-DNA interactions within the peroxisome proliferator-responsive element of the rat hydratase-dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.*, 268, 12939-12945.

Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432.

Zhong S., Goldberg I.J., Bruce C., Rubin E., Breslow J.L., Tall A. (1994). Human apo A-II inhibits the hydrolysis of HDL triglyceride and the decrease of HDL size induced by hypertriglyceridemia and cholestryler ester transfer protein in transgenic mice. *J. Clin. Invest.*, 94, 2457-2467.

Zimmerman J., Fainaru M., Eisenberg S. (1984). The effects of prednisone on plasma lipoproteins and apolipoproteins : a prospective study. *Metabolism*, 33, 521-526.

Zucker L.M., Zucker TF. (1961). 'Fatty', a new mutation in the rat. *J. Hered.*, 52, 275-278.

Zurlo F., Ferraro R., Fontvieille A.M., Rising R., Bogardus C., Ravussin E. (1992). Spontaneous physical activity and obesity : cross-sectional and longitudinal studies in Pima Indians. *Am. J. Physiol.*

## **LISTE DE PUBLICATIONS**

T. Lemberger, B. Staels, R. Saladin, B. Desvergne, J. Auwerx and W. Wahli (1994). Regulation of the Peroxisome Proliferator-activated receptor  $\alpha$  Gene by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.*, 269, 24527-24530. (PUBLICATION III)

B. Staels, R. Saladin, J. Auwerx (1995). Contrôle hormonal des gènes impliqués dans le métabolisme lipoprotéique chez le rat.

*Cah. Nutr. Diét.*, 30, 43-48.

B. Staels, N. Vu Dac, V.A. Kosykh, R. Saladin, J.C. Fruchart, J. Dallongeville and J. Auwerx (1995). Fibrates downregulate Apolipoprotein C-III expression independent on induction of Peroxisomal Acyl Coenzyme A Oxidase.

*J. Clin. Invest.*, 95, 705-712.

P. De Vos, R. Saladin, J. Auwerx and B. Staels (1995). Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake.

*J. Biol. Chem.*, 270, 15958-15961. (PUBLICATION V)

C. Aperlo, P. Pognonec, R. Saladin, J. Auwerx and K. Boulukos (1995).

Characterization of the transcriptional activities of the hamster peroxisome proliferator activated receptor, hPPAR $\gamma$ .

*Gene*, 162, 297-302.

R. Saladin, P. De Vos, M. Guerre-Millo, A. Leturque, J. Girard, B. Staels, J. Auwerx (1995). Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration.

*Nature*, 377, 527-529. (PUBLICATION VI)

R. Saladin, L. Berthou, D. Branellec, P. Calder, J.C. Fruchart, P. Denèfle, J. Auwerx and B. Staels (1995). Down regulation of Apolipoprotein A-I and A-II gene expression by fibrates and dietary fish oil.

*Eur. J. Biochem.*, 232, 179-187. (PUBLICATION II)

R. Saladin, T. Lemberger, F. Assimacopoulos, B. Staels, W. Wahli and J. Auwerx (1995). Expression of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\alpha$  Gene is Stimulated by Stress and follows a Diurnal Rhythm.

*J. Biol. Chem.*, 271, 1764-1769. (PUBLICATION IV)

T. Lemberger, O. Braissant, C. Juge-Aubry, H. Keller, R. Saladin, B. Staels, J. Auwerx, A.G. Burger, C.A. Meier and W. Wahli. (1995). PPAR tissue distribution and interactions with other hormone-signalling pathways. Ann. N.Y. Acad. Sci. in press.

R. Saladin, B. Staels and J. Auwerx (1995). Apolipoprotein A-I gene expression is controlled by Dexamethasone.

Eur. J. Biochem. submitted. (PUBLICATION I)

B. Staels, S. Vilaro, D.W. Hum, M. Reina, R. Saladin, J. Auwerx (1996). Expression and regulation of the lipoprotein lipase gene in human adrenal cortex.

J. Biol. Chem. submitted.

## PUBLICATION I

TRANSCRIPTIONAL INDUCTION OF RAT LIVER  
APOLIPOPROTEIN A-I GENE EXPRESSION BY  
GLUCOCORTICOIDS REQUIRES THE GLUCOCORTICOID  
RECEPTOR AND A LABILE TISSUE-SPECIFIC PROTEIN

Régis Saladin, Ngoc Vu Dac, Jean-Charles Fruchart, Johan Auwerx,  
et Bart Staels

Eur. J. Biochem., 1996, soumis

**TRANSCRIPTIONAL INDUCTION OF RAT LIVER  
APOLIPOPROTEIN A-I GENE EXPRESSION BY  
GLUCOCORTICOIDS REQUIRES THE GLUCOCORTICOID  
RECEPTOR AND A LABILE TISSUE-SPECIFIC PROTEIN**

**Régis Saladin, Ngoc Vu-Dac, Jean-Charles Fruchart, Johan Auwerx, and Bart  
Staels**

From the U.325 INSERM, Département d'Athérosclérose, Institut Pasteur, 59019 Lille, France

Subdivision: 6. molecular cell biology and metabolism

Running title: apolipoprotein gene regulation by glucocorticoids

Address correspondence to:

Dr. Bart Staels  
U.325 INSERM  
Institut Pasteur de Lille  
1, rue du Prof. Calmette  
BP 245  
59019 Lille Cédex  
FRANCE  
Tel : (33)-20-87 73 88  
Fax (33)-20-87 73 60

**ABBREVIATIONS:**

apo, apolipoprotein

CHX, cycloheximide

GR, glucocorticoid receptor

HDL, high density lipoprotein

LDL, low density lipoprotein

MMTV-LTR, mouse mammary tumour virus - long terminal repeat

TAT, tyrosine aminotransferase

VLDL, very low density lipoprotein

## SUMMARY

Treatment with glucocorticoids increases plasma high density lipoprotein (HDL) concentrations, which are inversely correlated to the development of atherosclerosis. Previously, we demonstrated that repeated administration of glucocorticoids increases apolipoprotein (apo) A-I and decreases apo A-II gene expression in rat liver. In the present study, the mechanism of glucocorticoid action on hepatic apo A-I and apo A-II expression was studied. A single injection of rats with dexamethasone increased hepatic apo A-I mRNA levels within 6 hr and a further rise was observed after 12 and 24 hr. In contrast, liver apo A-II mRNA levels gradually decreased after dexamethasone, dropping to less than 25% of controls after 24 hr. In rat primary hepatocytes and McARH8994 hepatoma cells, addition of dexamethasone increased apo A-I mRNA in a time- and dose-dependent manner, whereas apo A-II mRNA levels remained unchanged. Simultaneous addition of the glucocorticoid antagonist RU486 prevented the increase in apo A-I mRNA after dexamethasone, suggesting that the effects of dexamethasone are mediated through the glucocorticoid receptor. Actinomycin D transcription inhibition and nuclear run on experiments in McARH8994 cells and primary hepatocytes showed that dexamethasone induced apo A-I, but not apo A-II gene transcription. Transient transfection assays in McARH8994 cells using a CAT vector driven by the rat apo A-I gene promoter demonstrated that the proximal apo A-I promoter could be induced by dexamethasone, an effect which could be abolished by simultaneous treatment with RU486. However, in COS-1 cells, apo A-I promoter transcription was not induced by dexamethasone and/or co-transfected glucocorticoid receptor. In addition, the induction of apo A-I gene transcription by dexamethasone was blocked by the protein synthesis inhibitor cycloheximide, suggesting the presence of a labile protein involved in apo A-I gene activation by dexamethasone. In conclusion, our results demonstrate that dexamethasone regulates rat apo A-I, but not apo A-II, gene expression through a direct action on the hepatocyte. The induction of apo A-I gene transcription by dexamethasone requires the glucocorticoid receptor and a labile protein, which appears to be present only in liver cells.

Keywords: apolipoprotein, liver, gene expression, corticosteroid hormones

## INTRODUCTION

High plasma concentrations of high density lipoprotein (HDL) cholesterol are inversely related to the incidence of atherosclerosis [1, 2]. The major protein constituents of HDL are apolipoprotein (apo) A-I and apo A-II. Epidemiological studies have suggested that the protective effect of HDL on atherosclerosis development is correlated to specific particles within HDL containing apo A-I and not apo A-II (LpA-I), as opposed to particles containing both apo A-I and apo A-II (LpA-I/A-II) [3]. Furthermore, studies in transgenic animals indicated that overexpression of human apo A-I confers resistance to early atherogenesis [4], whereas overexpression of apo A-II results in less protection and may even lead to increased atherosclerotic lesion development [5, 6]. These observations have raised interest in studying the factors regulating apo A-I and apo A-II gene expression and their mechanism of action.

The expression of the apo A-I and apo A-II genes is subject to regulation under a variety of conditions, such as during development and by various pharmacological and nutritional factors and hormones [7-11]. Corticosteroid hormones regulate development and homeostasis in complex eucaryotes. These hormones are ligands for receptors belonging to the nuclear receptor superfamily, the mineralo- and the glucocorticoid receptor [12, 13]. After binding to their ligands, the activated receptors interact with specific elements (hormone responsive elements) in the upstream region of specific target genes, thereby modulating their expression. One of the metabolic effects, seen after corticosteroid treatment, is a profound increase in plasma lipid levels, which might predispose subjects to an increased risk for atherosclerosis [14]. In humans treated with prednisone elevated very low density lipoprotein (VLDL) cholesterol and triglycerides and increased low density lipoprotein (LDL) and HDL cholesterol levels have been reported [15-18]. Similar to the situation in humans also in rat pleiotropic effects of corticosteroid treatment on lipoprotein metabolism are evident. In our previous work, we demonstrated that administration of the corticosteroid hormone hydrocortisone provoked a decrease in plasma total cholesterol concentrations without changing plasma triglycerides in rats [9]. In contrast, treatment with the synthetic corticosteroids, triamcinolone and dexamethasone, which have a predominant glucocorticoid action, increased plasma HDL cholesterol [19] and apo A-I concentrations in rats [9]. The effects of corticosteroids on plasma HDL concentrations

are, at least in part, linked to their effects on the expression of genes involved in HDL metabolism, such as the LCAT, HL and the different apolipoprotein genes [9, 19]. Indeed, repeated administration of corticosteroids to rats results in an increase in liver, but not intestinal apo A-I gene expression, whereas liver apo A-II gene expression is decreased [9].

In the present study, we investigated the molecular and cellular mechanisms underlying the regulation of hepatic apo A-I and apo A-II gene expression by corticosteroids *in vivo* and *in vitro* utilizing two different cell culture model systems, ie. primary cultures of adult rat hepatocytes and the rat hepatoma cell line, McARH8994 [20]. In order to validate these cell culture models, the expression of various apolipoprotein genes (apo A-I, apo A-II and apo E) was compared between these two models and adult rat liver. Next, we used these cell model systems to investigate the regulation of apo A-I and apo A-II gene expression by the synthetic corticosteroid dexamethasone. Our results demonstrate that the action mechanisms of glucocorticoids on apo A-I and apo A-II gene expression are different. In both tissue culture systems, dexamethasone treatment induced apo A-I gene expression at the transcriptional level. This induction was dependent on the presence of the glucocorticoid receptor and a labile liver-specific protein. In contrast to apo A-I, the *in vivo* effects of dexamethasone on apo A-II gene regulation could not be observed *in vitro* pointing to indirect regulatory mechanisms.

## MATERIALS AND METHODS

### *Materials*

Leibovitz (L)-15, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), trypsin, L-glutamine and horse serum were purchased from Gibco BRL (Eragny, France); fetal calf serum (FCS) from Dutscher S.A. (Brumath, France); bovine serum albumin (BSA) and dexamethasone from Sigma (St Louis, USA); actinomycin D and cycloheximide from Boehringer Mannheim (Meylan, France); and ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)UTP and <sup>3</sup>H-Chloramphenicol from ICN Nucleotides (Costa Mesa, USA). Mifepristone (RU486) was a kind gift from Roussel-UCLAF.

### *Animals and treatments*

Adult male Sprague-Dawley rats (200 g) received a single subcutaneous injection of dexamethasone (3.7 µg/g body weight; Solu-Decadron<sup>R</sup>). Control animals were sham-injected with vehicle. Control and treated animals (n=3/treatment group) were sacrificed after 6, 12 and 24 hr by exsanguination under ether anesthesia. Livers were removed immediately and frozen in liquid nitrogen.

### *Isolation of rat hepatocytes and cell culture*

Hepatocytes were isolated by collagenase perfusion of livers from male Sprague-Dawley rats (body weight 150-250g) as described [11, 21]. Cell viability, as determined by the Trypan Blue exclusion test, was higher than 85%. The hepatocytes were cultured as monolayers ( $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) in L-15 medium supplemented with 10% (v/v) FCS, 0.2% (w/v) fatty acid free BSA, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM glutamine, 3 g/l glucose, and antibiotics at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air.

The rat hepatoma-derived cell line, McARH8994, was obtained from ATCC. Only cells from early passages (<20) were used for experiments. Cells were grown in DMEM without sodium pyruvate supplemented with 5% (v/v) FCS, 20% (v/v) horse serum, 2 mM L-glutamine and antibiotics for 3 days. At 50-60% confluence, cells were changed to fresh medium

containing mediators (dexamethasone, RU486, actinomycin D in ethanol). Control cells received vehicle only.

No cytotoxicity was observed at the concentrations of dexamethasone used. At the end of the experiments cells were washed with cold PBS and harvested by lysis in 4M guanidium isothiocyanate homogenisation buffer. All experiments were performed at least twice.

#### *RNA analysis*

Total cellular RNA was isolated from liver tissue or cultured cells by the acid guanidium thiocyanate/phenol-chloroform method [22]. Northern and RNA dot blot hybridizations were performed exactly as described previously [7]. The following apolipoprotein probes were used: a rat apo A-I cDNA probe comprising an 800-basepair fragment of the rat apo A-I starting from the 3' end [7]; a rat apo A-II cDNA clone containing the whole 3' untranslated region, mature peptide and propeptide coding region and part of the signal peptide region [23]; and a rat apo E cDNA clone containing all the coding region of the rat apo E sequence [7]. All probes were labeled by random primed labeling (Boehringer Mannheim). Filters were hybridized to  $1 \times 10^6$  cpm/ml of each probe as described [7]. They were washed in 300 ml of 0.5xSSC and 0.1% SDS for 10' at room temperature and twice for 30' at 65°C and subsequently exposed to X-ray film (Kodak X-OMAT-AR, Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y.). Autoradiograms were analyzed by quantitative scanning densitometry (Biorad GS670 Densitometer) as described [7].

#### *Nuclear run-on assays*

Nuclei were prepared from control and dexamethasone-treated cells and transcription run-on assays were performed as described by Nevins [24]. Equivalent counts of nuclear RNA labeled with  $\alpha$ -<sup>32</sup>P UTP (3000 Ci/mmol) were hybridized for 48 hours at 42°C to 5 µg of purified rat apo A-I, apo A-II and apo E cDNAs and as a negative control 5 µg of pBluescript vector DNA immobilized on Hybond-C Extra Filters (Amersham). After hybridization, filters were washed as described above and subsequently exposed to X-ray film. Autoradiograms were analyzed by quantitative scanning densitometry (Biorad GS670 Densitometer).

*Transient transfection experiments*

The rat apo A-I gene promoter containing fragments, spanning nucleotides -1000 to +15 (pCAT(-1000/+15)AI) and -250 to +15 (pCAT(-250/+15)AI) of the rat apo A-I gene [25], were PCR amplified using Sprague-Dawley rat spleen genomic DNA as a template (sense primers containing a HindIII cloning site: 5'-cgt aag ctt GTT AGC GTT GCC AAC ACA GGG TGG C-3' spanning nucleotides -1000 to -976 and 5'-cgt aag ctt GGG GAC CCT TGG AGT CTG CAG CTA-3' spanning nucleotides -252 to -229; antisense primer containing a BamHI cloning site: 5'-cgt gga tCC CTC CCC CGG AGC TCT CCA ACA-3' spanning nucleotides +26 to +4). The resulting PCR fragments were digested with BamHI and HindIII and cloned into the pBLCAT5 promoterless expression vector. McARH8994 and COS-1 cells were transfected by the calcium phosphate co-precipitation procedure with a mixture of plasmids, which contained in addition to the reporter (5 µg) and the glucocorticoid receptor (GR) expression vector, pRShGR $\alpha$  (0.5 µg), a cytomegalovirus-driven  $\beta$ -galactosidase vector used as an internal control for transfection efficiency. A mouse mammary tumour virus long terminal repeat-driven CAT vector (MMTV-LTR-CAT) was used as a positive control for GR transactivation [26]. All samples were complemented to an equal total amount of plasmid DNA using empty expression vector. After 6 hr of incubation cells were changed to fresh medium containing dexamethasone, RU486 or vehicle (ethanol) and incubated for another 36 hr. CAT activities were subsequently determined on cell extracts as described [27].

## RESULTS

### *In vivo regulation of apolipoprotein gene expression by dexamethasone*

Previously, we have shown that apo A-I gene expression increases after 4 days of daily injections with dexamethasone, whereas apo A-II decreases in rat liver [9]. In order to determine the short-term kinetics of apo A-I mRNA induction by dexamethasone, rats received a single injection and liver apo A-I and apo A-II mRNA levels were measured 6, 12 and 24 hr later. Apo A-I mRNA levels already increased 6 hours after dexamethasone injection and a further rise was observed at 12 and 24 hours (Figure 1). By contrast, liver apo A-II mRNA levels decreased to 77, 41 and 21% of control after 6, 12 and 24 hours respectively. After 24 hr of dexamethasone, both apo A-I and apo A-II mRNA attained levels comparable to 4 days of treatment [9], suggesting that a maximal effect was attained. Apo E mRNA levels decreased only slightly after dexamethasone treatment (79%), thereby confirming our previous observations [9].

### *Comparative expression of apolipoproteins in different cell model systems*

In order to study the cellular mechanisms of apo A-I and apo A-II gene regulation by corticosteroids, suitable cell culture models are required which respond upon corticosteroid treatment in a comparable manner as *in vivo*. Therefore, we analyzed the expression of our target genes in two cell culture systems, in primary rat hepatocytes (after 24 hr in culture) and in the rat hepatoma cell line McARH8994, and compared their expression to rat liver (Figure 2). Apo E mRNA levels were comparable between rat liver and both cell culture models (Figure 2). Relative to the liver (which was given an arbitrary value of 100%), primary hepatocytes and McARH8994 cells respectively contained 90% and 86% of rat liver apo E mRNA. Apo A-I mRNA levels were slightly lower in primary hepatocytes (75%), but approximately two-fold higher (206%) in McARH8994 cells (Figure 2). Apo A-II mRNA levels were highest in rat liver and approximately two-fold lower in primary hepatocytes (41%). In McARH8994 cells, much lower levels of apo A-II mRNA are expressed (2%) (Figure 2), which can only be detected after prolonged exposure of the autoradiograph (data not shown).

*Dose-dependent influence of dexamethasone on apolipoprotein mRNA levels*

In order to investigate the mechanism of action of corticosteroids on apo A-I and apo A-II gene expression at the cellular level, a dose response experiment was performed next on primary rat hepatocytes and McARH8994 cells. Incubation of McARH8994 cells for 24 hr with different concentrations of dexamethasone resulted in a dose-dependent increase of apo A-I mRNA (up to 10-fold) reaching a near-maximum at a concentration of  $10^{-7}$  M (Figure 3A). In contrast, no significant effect of dexamethasone was detected on apo A-II and apo E mRNA levels (Figure 3A). In primary rat hepatocytes dexamethasone caused a dose-dependent induction of apo A-I mRNA levels (Figure 3B). Similar to McARH8994 cells, apo A-II and apo E mRNA levels did not change significantly upon dexamethasone treatment in rat primary hepatocytes (Figure 3B).

*Time-dependent influence of dexamethasone on apolipoprotein mRNA levels*

Next, the kinetics of the effects of dexamethasone on apolipoprotein gene expression were studied. Incubation of McARH8994 cells with  $10^{-7}$  M of dexamethasone resulted in a slight (1.5-fold) increase in apo A-I mRNA levels after 6 hr, whereas after 12 hr of dexamethasone a near-maximal increase of apo A-I mRNA levels was attained (Figure 4A). When primary hepatocytes were treated with dexamethasone ( $10^{-6}$  M) apo A-I mRNA gradually increased reaching a 3-fold increase after 24 hr (Figure 4B). Consistent with the dose-response experiment, no effect of dexamethasone was observed on apo A-II and apo E mRNA levels both in primary hepatocytes and McARH8994 cells (Figure 4B), even after a prolonged 48 hr treatment (data not shown).

*Dexamethasone increases apo A-I expression at the transcriptional level*

In order to investigate whether the induction of apo A-I gene expression by dexamethasone was caused by transcriptional changes, experiments were performed next using the RNA polymerase inhibitor actinomycin D. Prior addition of actinomycin D to McARH8994 cells completely impeded the dexamethasone-mediated induction of apo A-I mRNA (Figure 5A). No effect of actinomycin D was observed on the expression of apo A-II and apo E mRNA

levels (Figure 5A). A similar inhibition of the dexamethasone-mediated induction of apo A-I mRNA by actinomycin D was observed in rat primary hepatocytes (Figure 5B). These results suggest that dexamethasone induces apo A-I gene expression at the transcriptional level.

To demonstrate unequivocally that the apo A-I gene is transcriptionally induced by dexamethasone, nuclear run-on assays were performed next. Incubation of McARH8994 cells with dexamethasone resulted in a 4-fold induction of apo A-I gene transcription rate (Figure 5C). In contrast, apo E gene transcription rate decreased slightly after dexamethasone, whereas apo A-II gene transcription remained unchanged (Figure 5C). Similarly to McARH8994 cells, treatment with dexamethasone increased the rate of apo A-I gene transcription in primary hepatocytes, whereas apo A-II and apo E transcription rates did not significantly change (Figure 5D).

#### *Effects of the glucocorticoid receptor antagonist RU486 on the dexamethasone-mediated induction of the apo A-I gene*

To study whether the regulation of apo A-I gene expression by dexamethasone is mediated via the GR, the effects of RU486, a competitive inhibitor of the GR, on the dexamethasone-mediated induction of the apo A-I gene was studied next. In McARH8994 cells, addition of RU486 alone did not influence apo A-I, apo A-II or apo E mRNA levels, but completely prevented the increase of apo A-I mRNA after dexamethasone (Figure 6A). In primary hepatocytes, the increase of apo A-I mRNA levels after dexamethasone was only partially inhibited by RU486 treatment, whereas a slight increase in apo A-I mRNA levels was observed with RU486 alone (Figure 6B). These data suggest that, in primary rat hepatocytes, RU486 may act as a partial GR agonist. A similar partial agonistic action of RU486 has been described in other (hepatoma) cell lines [28-30]. Alternatively, dexamethasone may exert pleiotropic effects in primary hepatocytes, which are independent of GR activation and act at a post-transcriptional level, maintaining a differentiated hepatocyte phenotype [31]. Finally, the incomplete inhibition by RU486 may also be linked to the rather short duration of the inhibitory effect of RU486 on dexamethasone GR activation in rat liver [32]. However, altogether these results indicate that the glucocorticoid receptor is involved in the induction of apo A-I gene

transcription by dexamethasone. This conclusion is corroborated by the fact that treatment with mineralocorticosteroid receptor agonist aldosterone did not affect apo A-I, apo A-II or apo E mRNA levels in McARH8994 cells (data not shown). Furthermore, the natural corticosteroid hydrocortisone, which displays both mineralo- and glucocorticoid activity, increases apo A-I mRNA levels respectively to 282+/-8% and 139+/-5% of control in McARH8994 cells and primary rat hepatocytes, whereas apo A-II and apo E mRNA levels remained unchanged (data not shown).

*Dexamethasone activates rat apo A-I gene promoter activity in McARH8994 cells*

To study the molecular mechanism of apo A-I gene regulation by dexamethasone, a 1 kb rat apo A-I gene promoter-containing DNA fragment was amplified by PCR from rat genomic DNA, cloned in front of a CAT reporter gene and transiently transfected in McARH8994 cells. Treatment with dexamethasone ( $10^{-7}$  M) increased apo A-I promoter-driven CAT activity approximately 3-fold compared to control (Figure 7A). Transient transfection of McARH8994 cells with a unilateral deletion mutant indicated that the dexamethasone-responsive sequences are localized within the first 250 bp of the rat apo A-I promoter, which contain the entire liver-specific enhancer [33, 34] (Figure 7A&B). Apo A-I promoter activation by dexamethasone was completely prevented by simultaneous addition of RU486, again demonstrating the involvement of the GR in mediating the activation of apo A-I gene transcription (Figure 7B&C). Co-transfection of the apo A-I gene promoter-CAT construct with a GR expression vector, however, did not result in a further activation of apo A-I promoter activity, thereby suggesting that McARH8994 cells contain saturating amounts of GR. Similarly, transfection of a classical GRE containing MMTV-LTR driven CAT vector [26] in McARH8994 cells resulted in a pronounced induction by dexamethasone, which was comparable whether co-transfected GR was present or not (Figure 7D).

*The effects of dexamethasone on apo A-I gene transcription are not mediated through a classical GRE and requires the presence of a labile liver-specific protein*

In order to study whether the rat apo A-I gene contains a classical GRE in the promoter region mediating its response to dexamethasone in McARH8994 cells, co-transfection experiments were performed next in COS-1 cells. These cells do not appear to contain endogenous GR, since dexamethasone alone did not influence MMTV-LTR promoter activity, but dexamethasone responsiveness is restored upon co-transfection of the GR (Figure 8). Interestingly, although basal apo A-I promoter transcriptional activity could be detected in COS-1 cells, treatment with dexamethasone did not result in any further activation of apo A-I promoter activity both in the presence or absence of co-transfected GR (Figure 8).

Finally, to study whether the induction of apo A-I gene expression by dexamethasone requires ongoing protein synthesis, McARH8994 cells and primary rat hepatocytes were treated with dexamethasone in the presence or not of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX). As expected, addition of dexamethasone to the culture medium resulted in a significant increase of apo A-I mRNA levels in both cell culture systems. However, treatment with CHX alone decreased apo A-I mRNA steady-state levels to 7% and 60% of controls in McARH8994 cells and primary rat hepatocytes respectively and completely prevented the induction of apo A-I gene expression by dexamethasone. In nuclear run-on experiments using McARH8994 cells, addition of CHX (10 µg/ml) for 1h30 to the culture medium decreased apo A-I transcription rates to 49%, indicating that the effects of CHX on apo A-I gene expression in McARH8994 cells occurred, at least in part, at the transcriptional level. Furthermore, whereas dexamethasone alone ( $10^{-7}$  M) increased apo A-I gene transcription to 175% of control, simultaneous addition of CHX and dexamethasone completely prevented the increase in apo A-I gene transcription (47% of control). These results suggest therefore that both basal and dexamethasone-induced apo A-I gene transcription is under positive control of a labile liver-specific protein.

## DISCUSSION

Both in humans and laboratory animals, such as the rat, treatment with corticosteroids has pronounced effects on plasma HDL metabolism, resulting in increased concentrations of plasma HDL and apo A-I [16, 18, 35, 36]. Results from this study and previous studies have shown that the action of corticosteroids is, at least partly, mediated via complex effects on the expression of genes involved in HDL metabolism. We and others have previously shown, using the rat as a model system, that corticosteroid treatment has pronounced effects on apolipoprotein gene expression, which result in increased apo A-I and decreased apo A-II mRNA levels in liver, but not intestine, suggesting that corticosteroids directly regulate HDL production [9, 37]. In addition to their effects on apolipoprotein gene expression, the increase in plasma HDL concentrations after corticosteroids is furthermore linked to their effects on the expression of enzymes involved in HDL remodelling, such as hepatic lipase and LCAT [19]. In this study, we analyzed in more detail the effects of dexamethasone, a potent and commonly used glucocorticoid, on apolipoprotein gene expression both *in vivo* in the rat as well as *in vitro* in primary rat hepatocyte culture and in the McA RH 8994 hepatoma cell line. A detailed *in vivo* time-course study, which covered the first 24 hr after a single dexamethasone administration, showed that the induction of apo A-I and the reduction of apo A-II mRNA levels was already evident 6 hr after injection of dexamethasone.

Using two different *in vitro* cell culture systems, primary rat hepatocytes and McARH8994 cells, we demonstrated that dexamethasone has a direct action on the hepatocyte by increasing steady-state levels of apo A-I mRNA in a dose- and time-dependent fashion. These data confirm and extend an initial report by Elshourbagy et al. [37] who demonstrated an induction of apo A-I mRNA levels in primary hepatocytes after prolonged treatment (96 hr) with dexamethasone. This induction in apo A-I gene expression by corticosteroids most likely leads to an increased production and secretion of apo A-I, as demonstrated previously by Matsumoto et al. [38] and Lin [39] in primary rat hepatocytes. In humans, a similar mechanism may be operative, since Varma et al. [40] reported that dexamethasone increased apo A-I mRNA levels and protein secretion in the culture medium of human HepG2 hepatoma cells.

Hydrocortisone, a hormone with both mineralo- and glucocorticoid action, provoked a similar, albeit less pronounced, induction of apo A-I gene expression compared to dexamethasone, which may be due to a lower relative potency and/or stability of hydrocortisone. Since the pure mineralocorticoid aldosterone did not affect apo A-I gene expression, our results suggest that apo A-I gene expression is regulated by corticosteroids by virtue of their glucocorticoid action. This observation is corroborated by the fact that the glucocorticoid antagonist RU486 completely prevents the induction of apo A-I mRNA levels and apo A-I gene transcription in McARH8994 cells and at least partially in primary rat hepatocytes. In addition, the induction of apo A-I gene expression after dexamethasone occurs at the transcriptional level, as demonstrated by nuclear run-on, actinomycin D and transient transfection experiments, and appears to involve the GR. However, in addition to the GR, the activation of apo A-I gene transcription by glucocorticoids appears to require additional factors. Indeed, co-transfection of the glucocorticoid receptor in COS-1 cells did not result in any activation of apo A-I promoter activity after dexamethasone treatment, whereas the classical MMTV-LTR GRE is clearly activated under these conditions. Furthermore, addition of the protein synthesis inhibitor cycloheximide to the culture medium precluded the dexamethasone-induced increase in apo A-I mRNA levels both in McARH8994 cells and in primary rat hepatocytes. The cycloheximide inhibition of apo A-I gene induction by dexamethasone is specific and not due to general toxic effects, since under identical conditions the expression of the PPAR $\alpha$  gene was activated by dexamethasone both in the presence or absence of cycloheximide [41]. Remarkably, cycloheximide treatment prevented the induction of apo A-I gene transcription within 90 minutes, suggesting the involvement of a labile short-lived tissue-specific protein in the response of apo A-I gene transcription to dexamethasone. A similar situation occurs for the insulin mediated induction of the glucokinase gene in rat hepatocytes, which is already apparent within 1 hr after addition of insulin, but is completely blocked by protein-synthesis inhibitors, such as cycloheximide [42, 43]. This protein may be either a co-factor or an adapter protein of the GR, which is required for transactivation of the apo A-I gene promoter by the GR [44-46]. Alternatively, it may be a transcription factor which binds to a distinct *cis*-element in the apo A-I gene promoter and acts cooperatively with the GR to mediate

glucocorticoid induction. Such a mechanism has been implicated in the regulation of the rat alpha-1-acid glycoprotein and rat tyrosine aminotransferase (TAT) gene promoters by the glucocorticoid receptor [47, 48]. In the case of the TAT gene, a *cis*-acting element, termed Glucocorticoid Modulatory Element (GME) [48], was identified, which enhances responsiveness of the TAT gene at low physiological concentrations of corticosteroids and increases the agonist activity of partial antiglucocorticoids, such as RU486 [49]. In this respect, it is interesting to note that, both in primary rat hepatocytes and in McARH8994 cells, the induction of apo A-I gene expression is already detectable at concentrations ( $10^{-8}$  M) of dexamethasone comparable to those required for TAT induction [50]. The activation of gene expression by glucocorticoids may furthermore trigger a disruption of the nucleosome structure [51] thereby promoting the recruitment of transcription factors, such as the ubiquitous factor nuclear factor 1 on the MMTV promoter [52], or the liver-specific factor HNF3 on the TAT promoter [53]. Since the apo A-I gene promoter has been shown to contain functional HNF3 binding sites [54], it is tempting to speculate that binding of HNF3 may be involved in the glucocorticoid regulation of apo A-I gene expression. In addition, glucocorticoid activation of gene transcription may also be enhanced through cross-talk with other pathways, such as via activation of the cAMP-protein kinase A and protein kinase C-*jun* signalling pathways [55-58]. In case of all mechanisms mentioned above, a glucocorticoid binding site should be present in the apo A-I gene promoter. Alternatively, it is possible that glucocorticoids activate apo A-I gene expression indirectly via the induction of an intermediate, liver-specific "second messenger", which is involved in the transcriptional regulation of the apo A-I gene and whose expression is under control of the glucocorticoid receptor. This transcription factor would then on its turn activate apo A-I gene transcription through sequences located in its proximal promoter region (the first 250 bp). Several transcription factors, such as HNF4, PPAR, RXR, Arp-1, HNF3 and Egr-1 [34, 54, 59-62], have been shown to interact with different sites in the apo A-I gene promoter. However, it is unlikely that factors binding to the apo A-I A site mediate the responsiveness to glucocorticoids, since dexamethasone was unable to stimulate transcription of the rat apo A-I A site cloned in front of the minimal apo A-I promoter (data not shown). Therefore, this factor(s) should interact with other sites in the apo A-I gene promoter,

such as is the case for HNF3 which binds to the apo A-I gene promoter B site [54]. However, since the induction of apo A-I gene transcription occurs rapidly (within 90 min. after treatment) and requires on-going protein synthesis (inhibition of the induction by CHX), it is not likely to involve a two-step mechanism. Further experiments are, however, required to elucidate the exact molecular mechanism of apo A-I transcription induction by glucocorticoids.

Since cycloheximide treatment alone reduced basal apo A-I mRNA levels in McARH8994 cells and primary rat hepatocytes through a decrease in apo A-I gene transcription, also basal apo A-I gene transcription appears to depend upon the presence of the same or another labile factor. It is tempting to speculate that the absence of intestinal expression of this protein might explain why glucocorticoids do not affect intestinal apo A-I mRNA levels [9].

In contrast to the data on the induction of apo A-I expression, which is clearly due to a transcriptional stimulation, the situation for apo A-II is different. Apo A-II mRNA levels decrease after the administration of glucocorticoid hormones *in vivo*. In primary rat hepatocyte cultures, however, apo A-II mRNA expression was unchanged by the addition of dexamethasone to the culture medium. This might point to the fact that the induction of apo A-II mRNA *in vivo* is not a direct glucocorticoid effect on apo A-II transcription in the liver, but instead is provoked by an indirect mechanism possibly secondary to corticosteroid-induced changes in plasma lipid and lipoprotein metabolism. These results extend our previous observations showing that, at least in rats, apo A-II mRNA levels are often controlled in a completely distinct manner compared to apo A-I. First, apo A-I and apo A-II mRNA levels are often regulated in an opposite fashion, such as during development or after administration of estrogens and thyroid hormones [7, 8]. Second, the mechanisms underlying this (opposite) regulation of apo A-I and apo A-II gene expression are also different. For instance, although steady levels of both apo A-I and apo A-II mRNA levels decrease after fibrate treatment in rats, only apo A-I gene expression is regulated at the transcriptional level, pointing towards a post-transcriptional mechanism controlling apo A-II regulation [10]. Furthermore, the decrease in apo A-I, but not apo A-II mRNA levels after fibrates and fatty acids is due to a direct action on the hepatocyte [63]. This situation is very reminiscent to our current observations with glucocorticoids, showing that the regulation of apo A-I and apo A-II gene expression is

completely distinct and often results in opposite changes in mRNA levels. Since both apolipoproteins have different functions in the process of reverse cholesterol transport, this distinctive regulation might be important in view of the anti-atherogenic properties of HDL particles and may open possibilities for the development of compounds, which specifically up-regulate apo A-I, without affecting apo A-II expression.

In conclusion, the results from this study indicate that glucocorticoids induce rat liver apo A-I, but not apo A-II gene expression at the transcriptional level through a direct action on the hepatocyte. This induction is mediated through sequences located in the proximal apo A-I gene promoter and appears to involve the glucocorticoid receptor and a labile protein present in liver, but not in other cells. Further studies are required to delineate the exact nature of the dexamethasone-response element in the apo A-I gene promoter and the proteins interacting with it.

## ACKNOWLEDGEMENTS

JA is a 'Directeur de Recherche' and BS a 'Chargé de Recherche' of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). This work is supported through grants from INSERM, BioAvenir and ARCOL. Roussel-UCLAF is thanked for the kind gift of mifepristone (RU486) and Ron Evans for the glucocorticoid receptor expression vector. We would like to thank Delphine Cayet for excellent technical assistance.

**REFERENCES**

1. Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B. & Dawber, T. R. (1977) High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham Study. *Am.J.Med.* 62,707-714.
2. Gordon, D. J. & Rifkind, B. M. (1989) High density lipoprotein - The clinical implications of recent studies. *N. Engl. J. Med.* 321,1311-1316.
3. Puchois, P., Kandoussi, A., Fievet, P., Fourtier, J. L., Bertrand, M., Koren, E. & Fruchart, J. C. (1987) Apolipoprotein A-I containing lipoproteins in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 68,35-40.
4. Rubin, E. M., Krauss, R. M., Spangler, E. A., Verstuyft, J. G. & Clift, S. M. (1991) Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 353,265-267.
5. Warden, C. H., Hedrick, C. C., Qiao, J. H., Castellani, L. W. & Lusis, A. J. (1993) Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A-II. *Science* 261,469-472.
6. Schultz, J. R., Verstuyft, J. G., Gong, E. L., Nichols, A. V. & Rubin, E. M. (1993) Protein composition determines the anti-atherogenic properties of HDL transgenic mice. *Nature* 365,762-764.
7. Staels, B., Auwerx, J., Chan, L., van Tol, A., Rosseneu, M. & Verhoeven, G. (1989) Influence of development, oestrogens and food intake on apolipoprotein A-I, A-II and E mRNA in the rat liver and intestine. *J. Lipid Res.* 30,1137-1145.

8. Staels, B., van Tol, A., Chan, L., Will, H., Verhoeven, G. & Auwerx, J. (1990) Alterations in thyroid status modulate apolipoprotein, hepatic triglyceride lipase, and low density lipoprotein receptor in rats. *Endocrinology* 127,1144-1152.
9. Staels, B., van Tol, A., Chan, L., Verhoeven, G. & Auwerx, J. (1991) Variable effects of different corticosteroids on plasma lipids, apolipoproteins, and hepatic apolipoprotein mRNA levels in rats. *Arterioscler. Thromb.* 11,760-769.
10. Staels, B., Van Tol, A., Andreu, T. & Auwerx, J. (1992) Fibrates influence the expression of genes involved in lipoprotein metabolism in a tissue-selective manner in the rat. *Arterioscler. Thromb.* 12,286-294.
11. Berthou, L., Staels, B., Saldicco, I., Berthelot, I., Casey, J., Fruchart, J.-C., Denèfle, P. & Branellec, D. (1994) Opposite in vitro and in vivo regulation of hepatic apolipoprotein A-I gene expression by retinoic acid. Absence of effects on apolipoprotein A-II gene expression. *Arterioscler. Thromb.* 14,1657-1664.
12. Evans, R. M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240,889-895.
13. Green, S. & Chambon, P. (1986) A superfamily of potentially oncogenic hormone receptors. *Nature* 324,615-617.
14. Nashel, D. J. (1986) Is atherosclerosis a complication of long-term corticosteroid treatment? *Am.J.Med.* 80,925-929.
15. Zimmerman, J., Fainaru, M. & Eisenberg, S. (1984) The effects of prednisone therapy on plasma lipoproteins and apolipoproteins: a prospective study. *Metabolism* 33,521-526.

16. Taskinen, M.-R., Kuusi, T., Yki-Järvinen, H. & Nikkilä, E. A. (1988) Short-term effects of prednisone on serum lipids and high density lipoprotein subfractions in normolipidemic healthy men. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 67,291-299.
17. Ettinger, W. H. J. & Hazzard, W. R. (1988) Prednisone increases very low density lipoprotein and high density lipoprotein in healthy men. *Metabolism* 37,1055-1058.
18. Ettinger, W. H., Klinefelter, H. F. & Kwiterovich, P. O. (1987) Effect of short-term, low-dose corticosteroids on plasma lipoprotein lipids. *Atherosclerosis* 63,167-172.
19. Jansen, H., van Tol, A., Auwerx, J., Skretting, G. & Staels, B. (1992) Opposite regulation of hepatic lipase and lecithin:cholesterol acyltransferase by glucocorticoids in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1128,181-185.
20. Becker, J. E., de Nechaud, B. & Potter, V. R. Two new rat hepatoma cell lines for studying the unbalanced blocked ontogeny hypothesis. In: Fishman WH, Sell S, ed. Onco-developmental gene expression. New York: New York: Academic Press, 1976: 259-270.
21. Berry, M. N. & Friend, D. S. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. Cell. Biol.* 43,506-520.
22. Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single step method for RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162,156-159.
23. Luo, C. C., Li, W. H., Moore, M. N. & Chan, L. (1986) Structure and evolution of the apolipoprotein multigene family. *J.Mol.Biol.* 187,325-340.
24. Nevins, J. R. (1987) Isolation and analysis of nuclear RNA. *Methods Enzymol.* 152,234-241.

25. Haddad, I. A., Ordovas, J. M., Fitzpatrick, T. & Karathanasis, S. K. (1986) Linkage, evolution, and expression of the rat apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV genes. *J. Biol. Chem.* 261,13268-13277.
26. Ham, J., Thomson, A., Needham, M., Webb, P. & Parker, M. (1988) Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumour virus. *Nucl. Acids Res.* 16,5263-5276.
27. Gorman, C. M., Moffat, L. F. & Howard, B. H. (1982) Recombinant genomes which express recombinant chloramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 2,1044-1051.
28. Fève, B., Antras, J., Lasnier, F., Hilliou, F. & Pairault, J. (1989) The antiglucocorticoid RU38486 is a potent accelerator of adipose conversion of 3T3-F422A cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 67,17-27.
29. Schweizer-Groyer, G., Cadepond, F., Groyer, A., Idziorek, T., Mariller, M. & Baulieu, E. E. (1988) Stimulation of specific transcription and DNA binding studies suggest that *in vitro* transformed RU486-glucocorticosteroid receptor complexes display agonist activity. *J.Steroid Biochem.* 30,291-294.
30. Simons, S. S. J., Mercier, L., Miller, N. R., Miller, P. A., Oshima, H., Sistare, F. D., Thompson, E. B., Wasner, G. & Yen, P. M. (1989) Differential modulation of gene induction by glucocorticoids and antiglucocorticoids in rat hepatoma tissue culture cells. *Cancer Res.* 49,2244S-2252S.
31. Spiegelberg, T. & Bishop, J. O. (1988) Tissue-specific gene expression in mouse hepatocytes cultured in growth-restricting medium. *Mol. Cell. Biol.* 8,3338-3344.

32. Alexandrova, M. (1992) Duration of antagonizing effect of RU486 on the agonist induction of tyrosine aminotransferase via glucocorticoid receptor. *J.Steroid Biochem.Molec.Biol.* 41,723-725.
33. Widom, R. L., Ladias, J. A., Kouidou, S. & Karathanasis, S. K. (1991) Synergistic interactions between transcription factors control expression of the apolipoprotein A-I gene in liver cells. *Mol. Cell. Biol.* 11,677-687.
34. Chan, J., Nakabayashi, H. & Wong, N. C. W. (1993) HNF-4 increases activity of rat apo A1 gene. *Nucl. Acids Res.* 21,1205-1211.
35. Berg, A. & Nilsson-Ehle, P. (1994) Direct effects of corticotropin on plasma lipoprotein metabolism in man - studies in vivo and in vitro. *Metabolism* 43,90-97.
36. Parker, C. R. J., MacDonald, P. C., Carr, B. R. & Morrison, J. C. (1987) The effects of dexamethasone and anencephaly on newborn serum levels of apolipoprotein A-1. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 65,1098-1101.
37. Elshourbagy, N. A., Boguski, M. S., Liao, W. S. L., Jefferson, L. S., Gordon, J. I. & Taylor, J. M. (1985) Expression of rat apolipoprotein A-IV and A-I genes: mRNA induction during development and in response to glucocorticoids and insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82,8242-8246.
38. Masumoto, A., Koga, S., Uchida, E. & Ibayashi, H. . (1988) Effects of insulin, dexamethasone and glucagon on the production of apolipoprotein A-I in cultured rat hepatocytes. *Atherosclerosis* 70,217-223.

39. Lin, R. C. (1988) Effects of hormones on apolipoprotein secretion in cultured rat hepatocytes. *Metabolism* 37,745-751.
40. Varma, V. K., Smith, T. K., Sorci-Thomas, M. & Ettinger, W. H. (1992) Dexamethasone increases apolipoprotein A-I concentrations in medium and apolipoprotein A-I mRNA abundance from Hep G2 cells. *Metabolism* 41,1075-1080.
41. Lemberger, T., Staels, B., Saladin, R., Desvergne, B., Auwerx, J. & Wahli, W. (1994) Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 269,24527-24530.
42. Matsuda, T., Noguchi, T., Yamada, K., Takenaka, M. & T., T. (1990) Regulation of the gene expression of glucokinase and L-type pyruvate kinase in primary cultures of rat hepatocytes by hormones and carbohydrates. *J.Biochem.(Tokyo)* 108,778-784.
43. Kurokawa, R., Soderstrom, M., Horlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M. G. & Glass, C. K. (1995) Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* 377,451-454.
44. Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P. & Tora, L. (1994) Human TAFII-30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* 79,107-117.
45. Halachmi, S., Marden, E., Martin, G., MacKay, H., Abbondanza, C. & Brown, M. (1994) Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* 264,1455-1458.

46. Lee, J. W., Ryan, F., Swaffield, J. C., Johnston, S. A. & Moore, D. D. (1995) Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature* 374,91-94.
47. Di Lorenzo, D., Williams, P. & Ringold, G. (1991) Identification of two distinct nuclear factors with DNA binding activity within the glucocorticoid regulatory region of the rat alpha-1-acid glycoprotein promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176,1326-1332.
48. Oshima, H. & Simons, S. S. J. (1992) Modulation of transcription factor activity by a distant steroid modulatory element. *Mol. Endocrinol.* 6,416-428.
49. Oshima, H. & Simons, S. S. J. (1993) Sequence-selective interactions of transcription factor elements with tandem glucocorticoid-responsive elements at physiological steroid concentrations. *J. Biol. Chem.* 268,26858-26865.
50. Simons, S. S. J., Oshima, H. & Szapary, D. (1992) Higher levels of control: modulation of steroid hormone-regulated gene transcription. *Mol. Endocrinol.* 6,995-1002.
51. Archer, T. K., Lefebvre, P., Wolford, R. G. & Hager, G. L. (1992) Transcription factor loading on the MMTV promoter: a bimodal mechanism for promoter activation. *Science* 255,1573-1576.
52. Pina, B., Brüggemeier, U. & Beato, M. (1990) Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter. *Cell* 60,719-731.
53. Rigaud, G., Roux, J., Pictet, R. & Grange, T. (1991) In vivo footprinting of rat TAT gene: dynamic interplay between the glucocorticoid receptor and a liver specific factor. *Cell* 67,977-986.

54. Harnish, D. C., Malik, S. & Karathanasis, S. K. (1994) Activation of apolipoprotein AI gene transcription by the liver-enriched factor HNF-3. *J. Biol. Chem.* 269,28220-28226.
55. Diamond, M. I., Miner, J. N., Yoshinaga, S. K. & Yamamoto, K. R. (1990) Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* 249,1266-1272.
56. Rangarajan, P. N., Umesono, K. & Evans, R. M. (1992) Modulation of glucocorticoid receptor function by protein kinase A. *Mol. Endocrinol.* 6,1451-1457.
57. Reik, A., Stewart, F. & Schütz, G. (1994) Cross-talk modulation of signal transduction pathways: two mechanisms are involved in the control of tyrosine aminotransferase gene expression by phorbol esters. *Mol. Endocrinol.* 8,490-497.
58. Espinas, M. L., Roux, J., Pictet, R. & Grange, T. (1995) Glucocorticoids and protein kinase A coordinately modulate transcription factor recruitment at a glucocorticoid-responsive unit. *Mol. Cell. Biol.* 15,5346-5354.
59. Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Laine, B., Fruchart, J. C., Auwerx, J. & Staels, B. (1994) Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *J. Biol. Chem.* 269,31012-31018.
60. Widom, R. L., Rhee, M. & Karathanasis, S. K. (1992) Repression by ARP-1 sensitizes apolipoprotein A-I gene responsiveness to RXR $\alpha$  and retinoic acid. *Mol. Cell. Biol.* 12,3380-3389.

61. Ladias, J. A. A. & Karathanasis, S. K. (1991) Regulation of the apolipoprotein A-I gene by ARP-1 a novel member of steroid receptor superfamily. *Science* 251,561-565.
62. Kilbourne, E. J., Widom, R., Harnish, D. C., Malik, S. & Karathanasis, S. K. (1995) Involvement of early growth response factor Egr-1 in apolipoprotein AI gene transcription. *J. Biol. Chem.* 270,7004-7010.
63. Berthou, L., Saladin, R., Yaqoob, P., Calder, P., Fruchart, J. C., Denefle, P., Auwerx, J. & Staels, B. (1995) Regulation of rat liver apolipoprotein A-I, apolipoprotein A-II, and acyl-CoA oxidase gene expression by fibrates and dietary fatty acids. *Eur. J. Biochem.* 232,179-187.

**FIGURE LEGENDS**

Figure 1. Kinetics of apo A-I, apo A-II and apo E gene regulation by dexamethasone in rat liver. Adult male rats ( $n=3$ /group) received a single injection of dexamethasone (3.7  $\mu$ g/g body weight; Dexa) or vehicle (Control). Animals were sacrificed after 6, 12 and 24 hr, total RNA was extracted and apolipoprotein mRNA levels were measured and expressed (mean +/- SD) as described in Materials and Methods.

Figure 2. Comparative analysis of apolipoprotein gene expression in rat liver, primary rat hepatocytes and McARH8994 hepatoma cells. (A) Quantitative northern blot analysis taking the expression of the different apolipoproteins in adult rat liver as 100%. (B) Northern blot analysis. Total RNA (20  $\mu$ g) was subjected to electrophoresis, transferred on a nylon membrane, and hybridized to the indicated probes as described in Materials and Methods.

Figure 3. Dose-dependent effects of dexamethasone on apo A-I, apo A-II and apo E mRNA levels. McARH8994 (A) cells and primary rat hepatocytes (B) were treated for 24 hours with the indicated concentrations of dexamethasone. RNA was extracted and apo A-I, apo A-II and apo E mRNA levels were measured by dot blot analysis.

Figure 4. Time-dependent effects of dexamethasone on apo A-I, apo A-II and apo E mRNA levels. (A) McARH8994 cells were treated with  $10^{-7}$  M of dexamethasone for the indicated periods of time. (B) Isolated rat hepatocytes were treated with  $10^{-6}$  M of dexamethasone for the indicated periods of time. RNA was extracted and apo A-I, A-II and E mRNA levels were measured by dot blot analysis.

Figure 5. Apolipoprotein gene transcription after dexamethasone. (A) Actinomycin D (5  $\mu$ g/ml; Act.D) was added to McARH8994 cells 1h30 before treatment with dexamethasone ( $10^{-7}$  M; Dexa) or vehicle (Control) and cells were incubated for another 12 hours. (B) Actinomycin D (5  $\mu$ g/ml; Act.D) was added to primary rat hepatocytes 1h30 before treatment with dexamethasone ( $10^{-6}$  M; Dexa) or vehicle (Control) and cells were incubated for another 6

hours. RNA extraction and measurement of apo A-I, apo A-II and apo E mRNA levels were performed by dot blot analysis as described under Materials and Methods. (C&D) Nuclear run-on assays were performed on McARH8994 cells treated for 12 hr with dexamethasone (Dexa;  $10^{-7}$  M) or vehicle (Control) (C) or on primary rat hepatocytes treated for 6 hr with dexamethasone (Dexa;  $10^{-6}$  M) or vehicle (Control) (D) as described under Materials and Methods.

Figure 6. The glucocorticoid receptor antagonist RU486 inhibits the induction of apo A-I gene expression by dexamethasone. (A) McARH8994 cells were treated with dexamethasone (Dexa;  $10^{-7}$  M) or vehicle (Control) for 12 hr in the presence or not of RU486 ( $10^{-6}$  M) added simultaneously to the culture medium. (B) Isolated rat hepatocytes were treated with dexamethasone (Dexa;  $10^{-6}$  M) or vehicle (Control) for 12 hr in the presence or not of RU486 ( $10^{-5}$  M) added simultaneously to the culture medium. RNA extraction and measurement of apo A-I, apo A-II and apo E mRNA levels were performed by dot blot analysis as described under Materials and Methods.

Figure 7. Influence of dexamethasone on apo A-I promoter transcription. (A) McARH8994 cells were transiently transfected with the indicated reporter plasmids and subsequently treated with dexamethasone (Dexa;  $10^{-7}$  M) or vehicle (Con) as described under Materials and Methods. (B) The apo A-I promoter containing pCAT(-252/+26)AI vector was co-transfected with either the empty or the GR containing expression plasmid and cells were subsequently treated with dexamethasone (Dexa;  $10^{-7}$  M) or vehicle in the presence or not of RU486 ( $10^{-6}$  M). (C) CAT assay demonstrating the effects of co-transfected GR expression vector, dexamethasone and/or RU486 on the pCAT(-252/+26)AI and MMTV-LTR-CAT vectors. CAT activity was measured and expressed (mean  $\pm$  S.D.) as described in Materials and Methods.

Figure 8. The glucocorticoid receptor does not activate apo A-I gene transcription in COS-1 cells. CAT assays demonstrating the effects of co-transfected GR expression vector in the presence (+) or not (-) of dexamethasone ( $10^{-7}$  M) on the pCAT(-252/+26)AI and MMTV-

LTR-CAT vectors. CAT activity was measured and expressed (mean  $\pm$  S.D.) as described in Materials and Methods.

Figure 9. The protein synthesis inhibitor cycloheximide prevents the induction of apo A-I gene expression by dexamethasone. (A) McARH8994 cells were treated with dexamethasone (Dexa;  $10^{-7}$  M) and/or cycloheximide (CHX; 10  $\mu$ g/ml) for 12 hr. (B) Isolated rat hepatocytes were treated with dexamethasone (Dexa;  $10^{-6}$  M) and/or cycloheximide (CHX; 10  $\mu$ g/ml) for 6 hr. RNA extraction and measurement of apo A-I, apo A-II and apo E mRNA levels were performed by dot blot analysis as described under Materials and Methods.

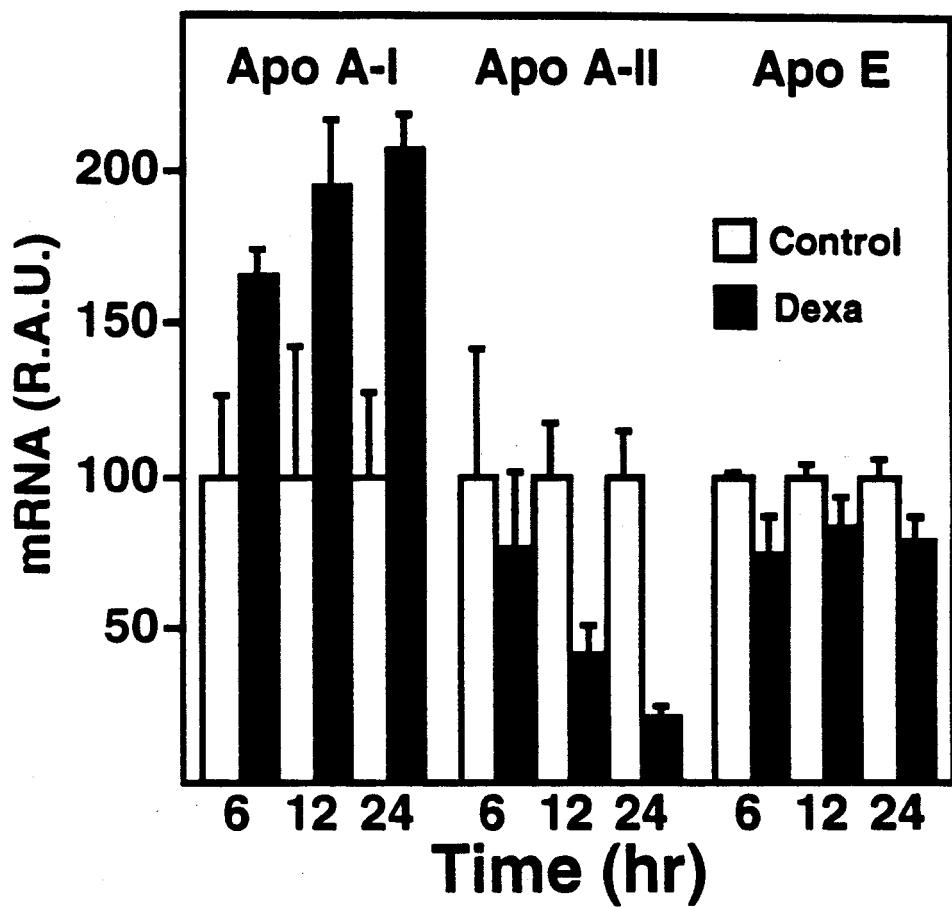


Fig.1 Saladin et al.

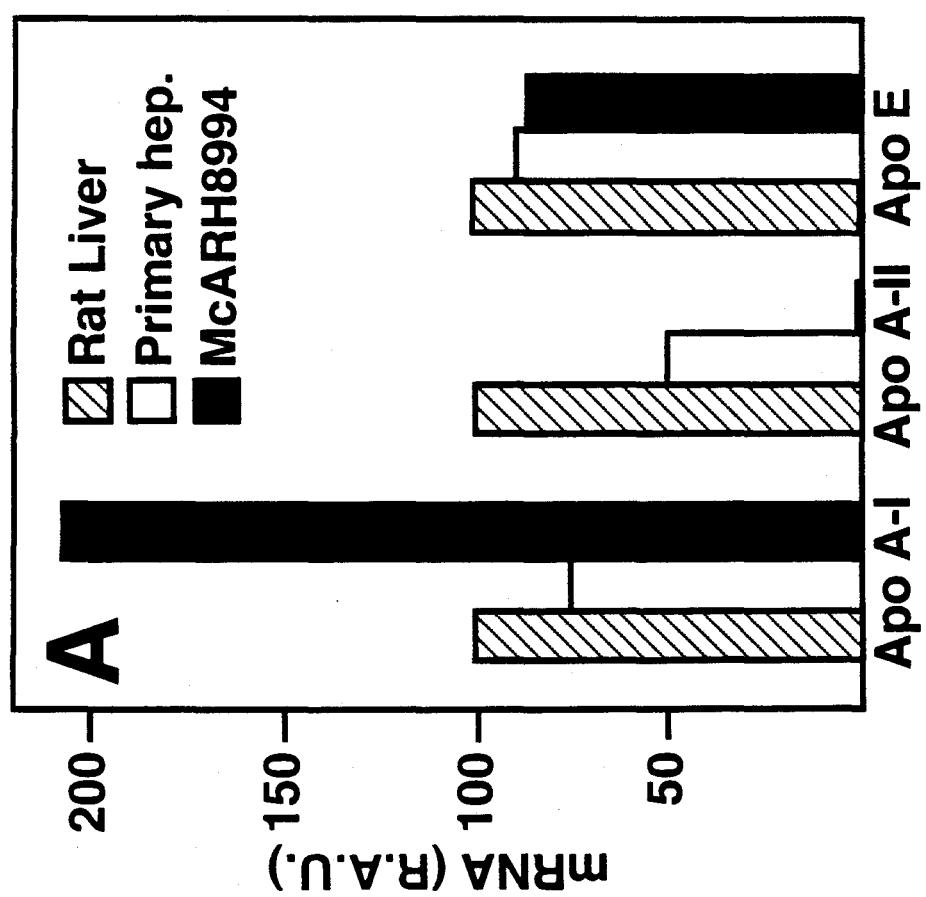
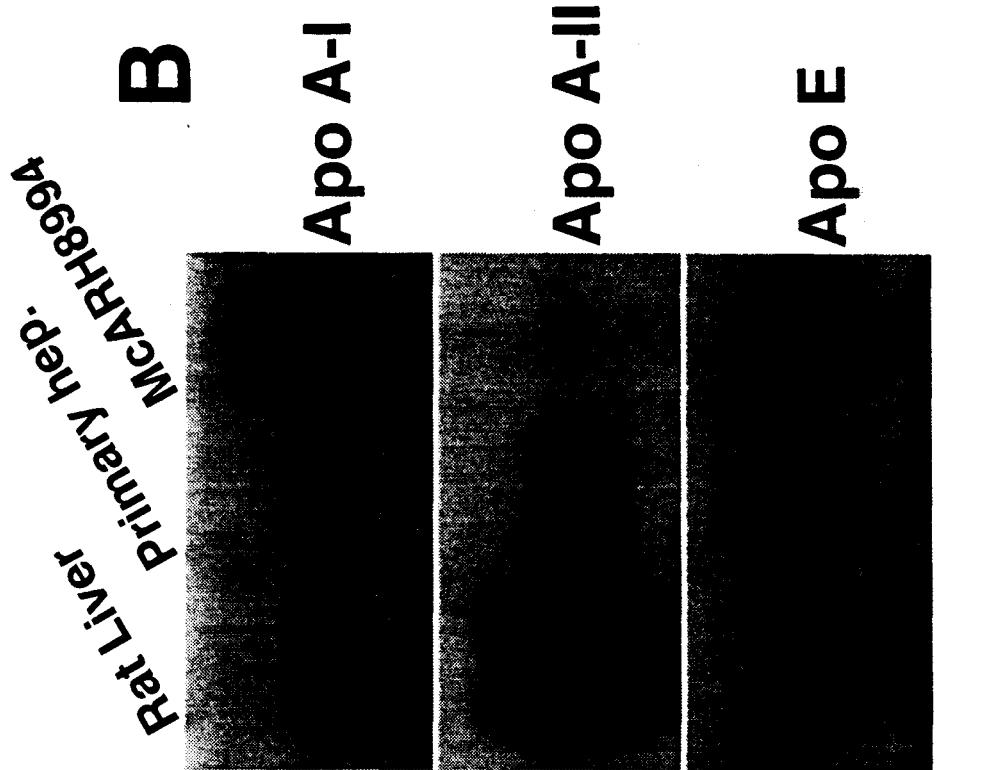


Fig.2 Saladin et al.

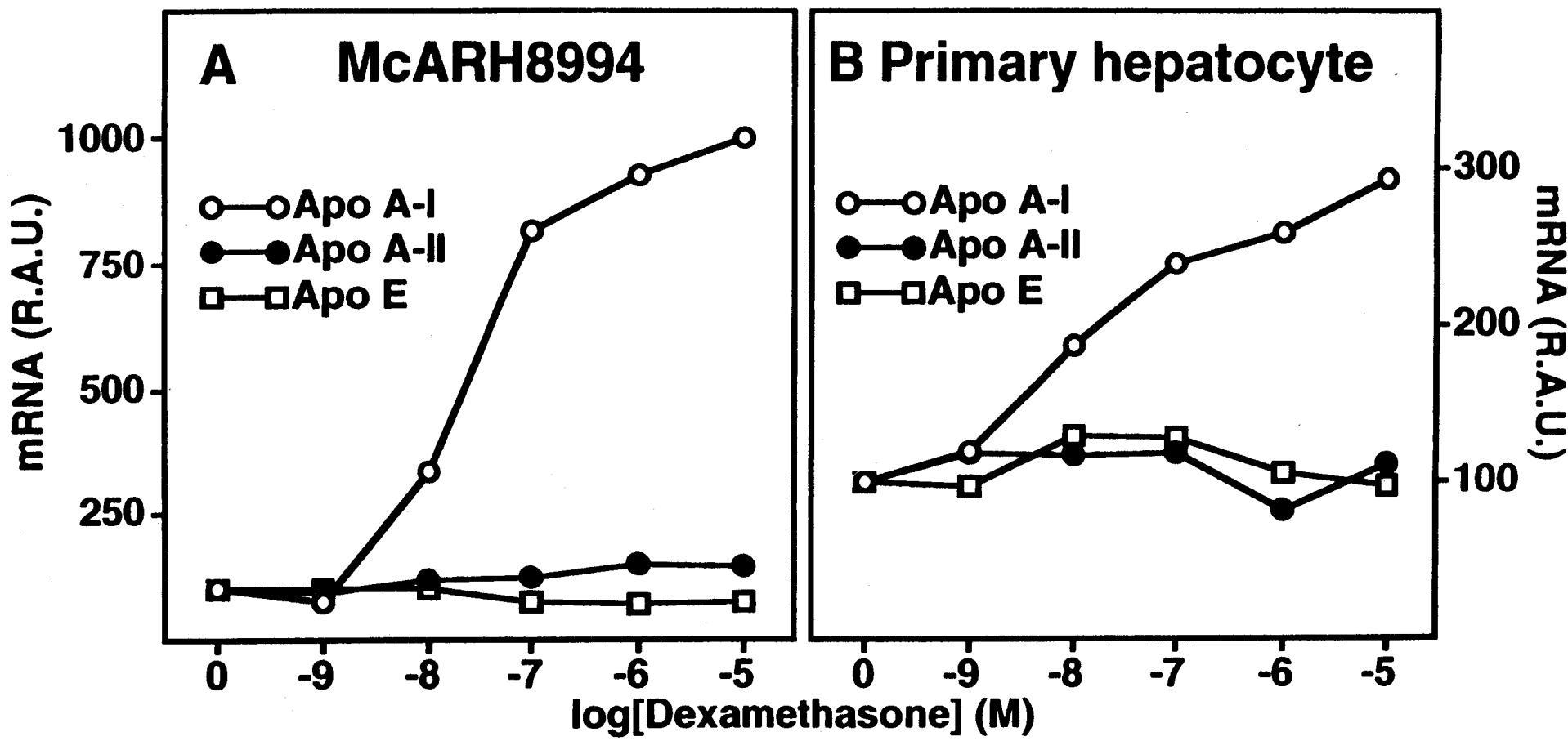


Fig.3 Saladin *et al.*

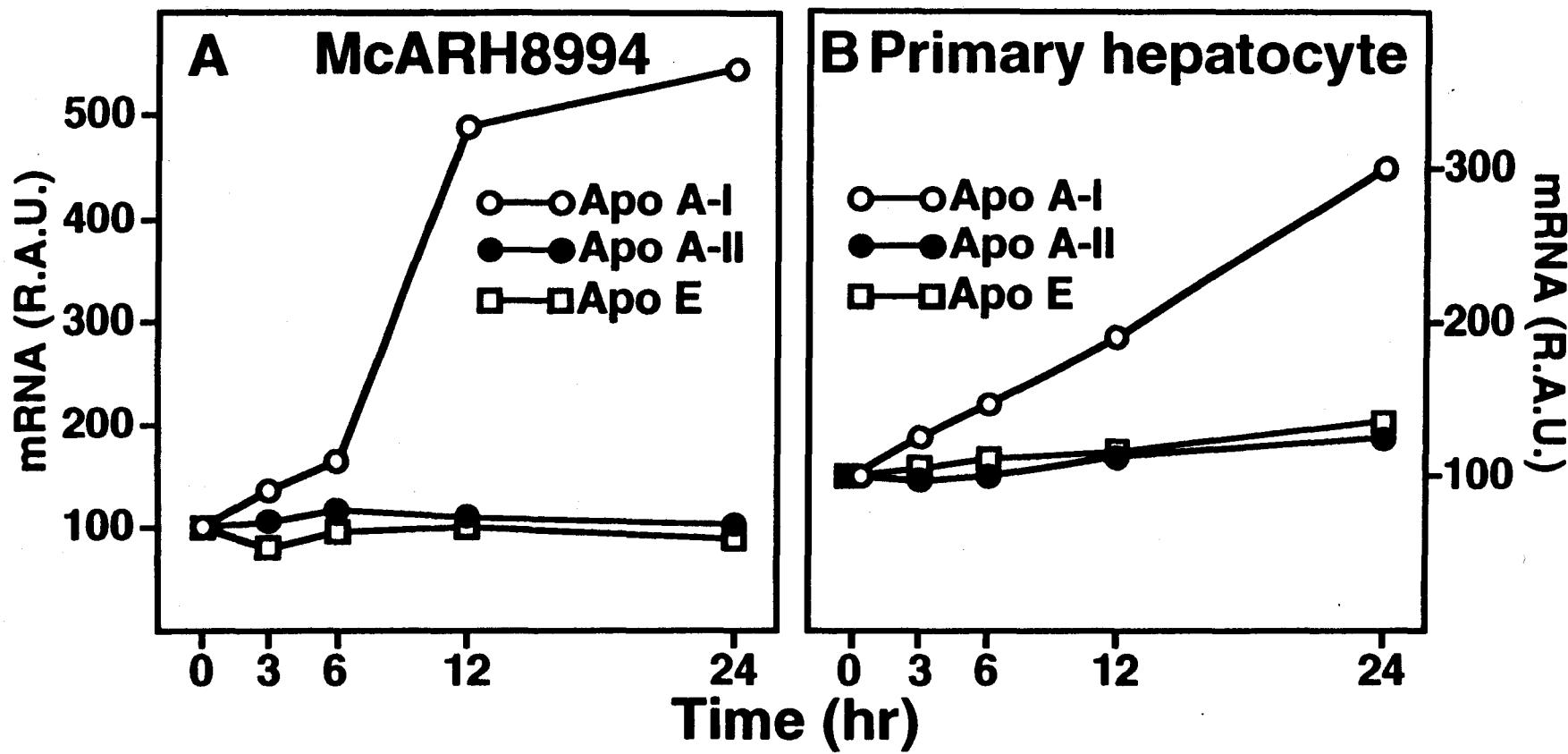


Fig.4 Saladin et al.

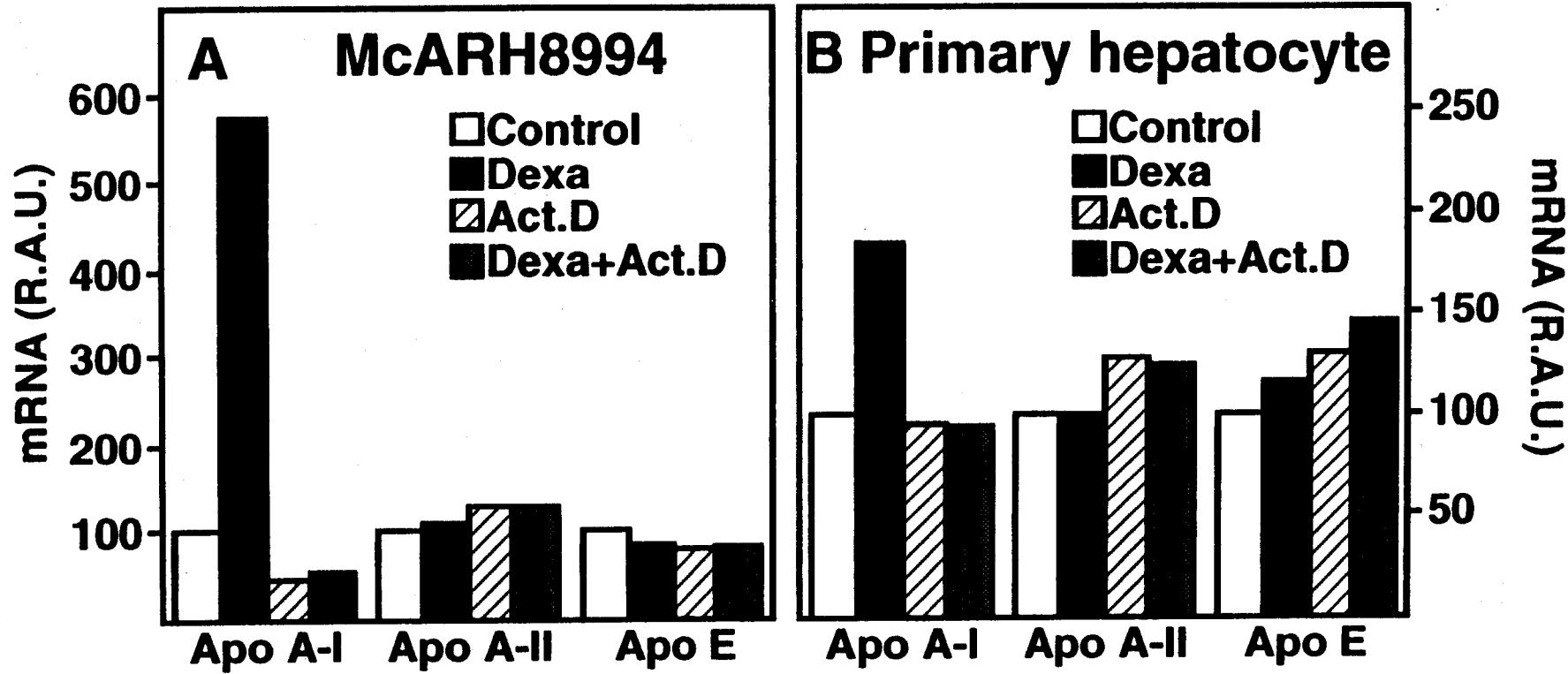


Fig.5A&B Saladin et al.

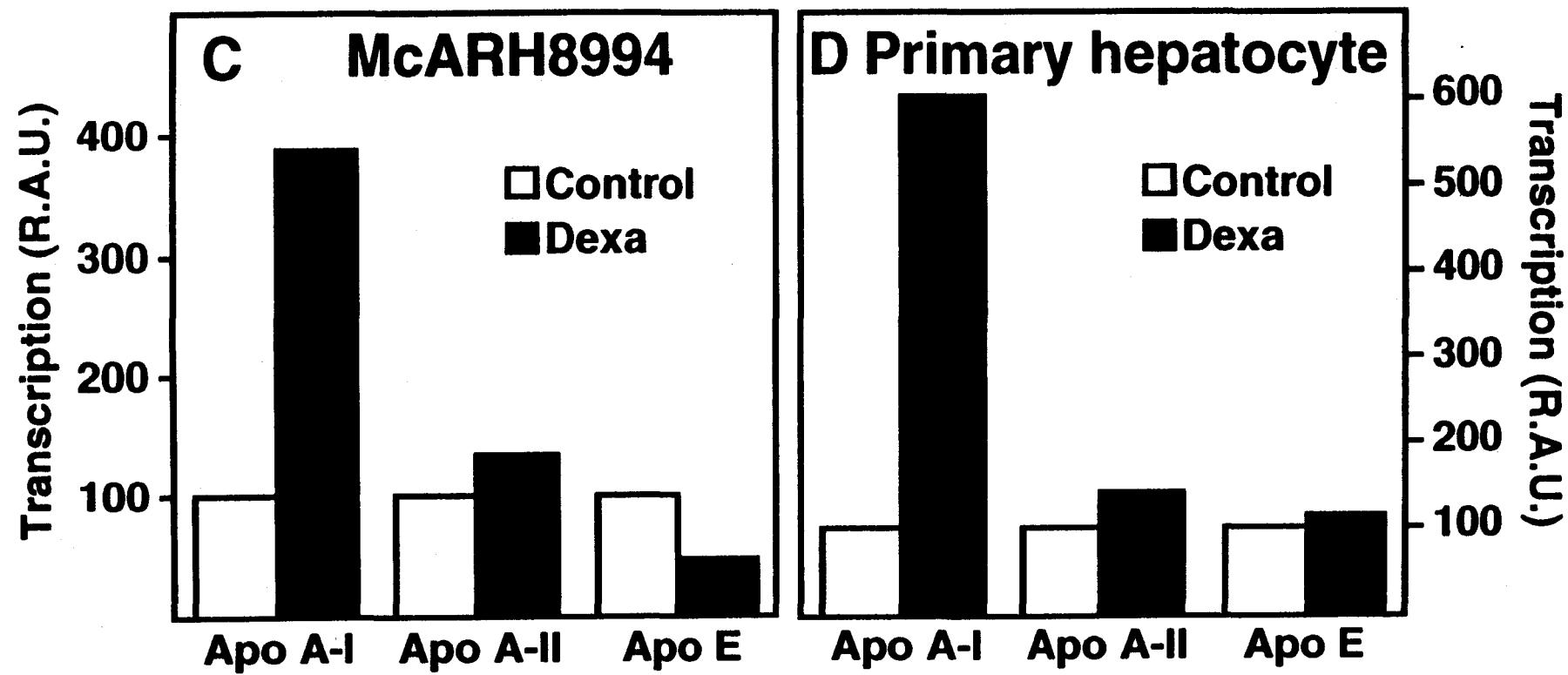


Fig.5C&D Saladin *et al.*

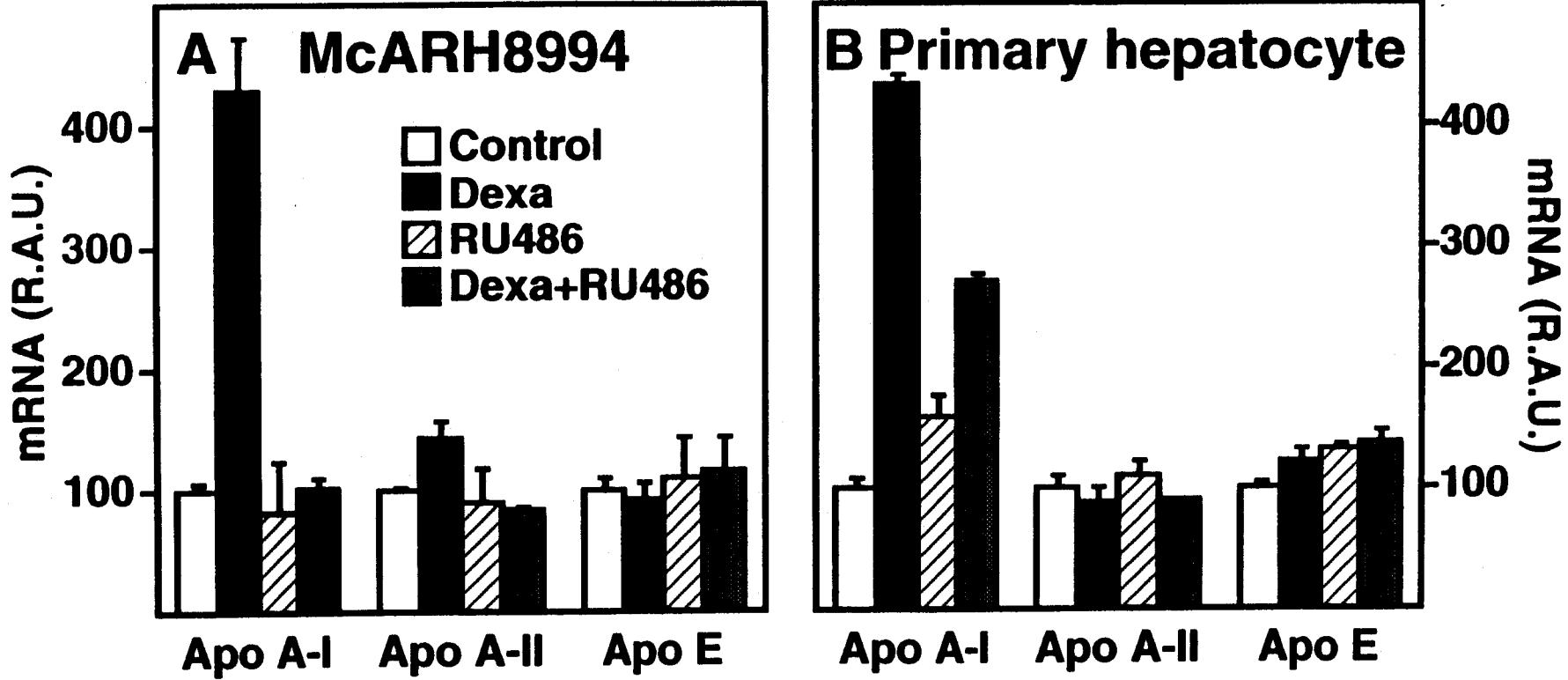


Fig.6 Saladin *et al.*

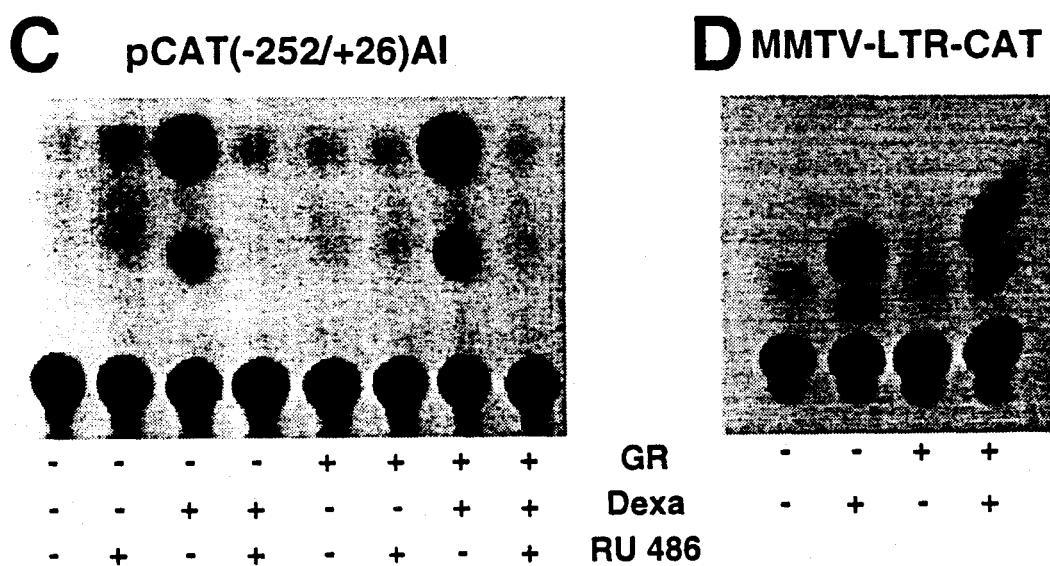
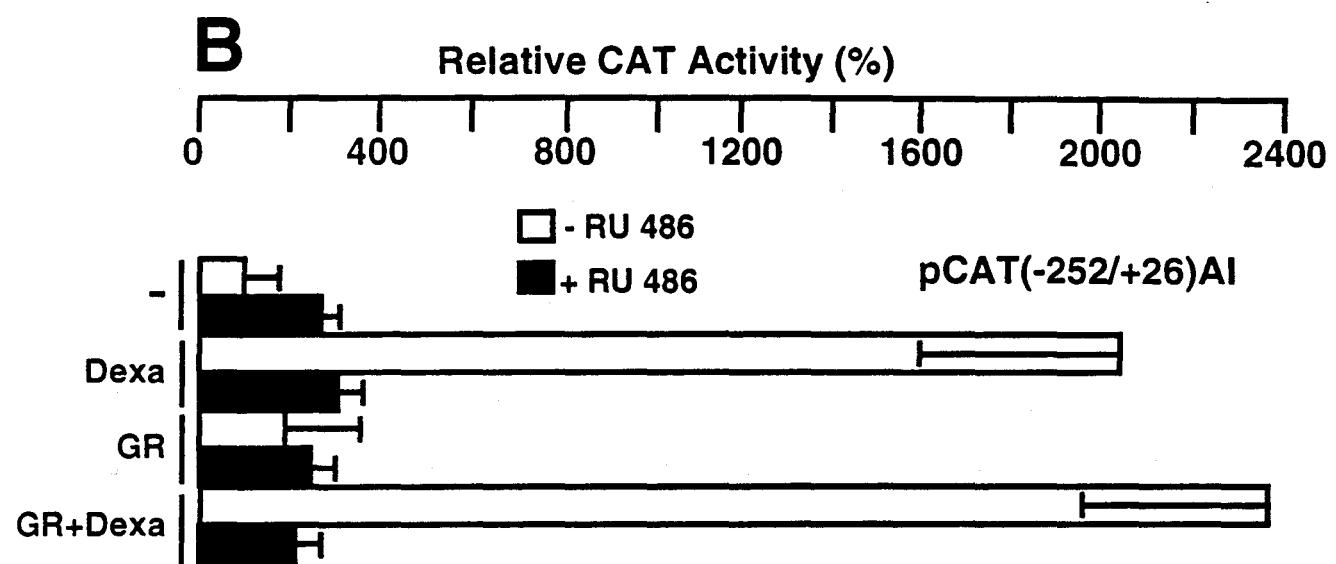
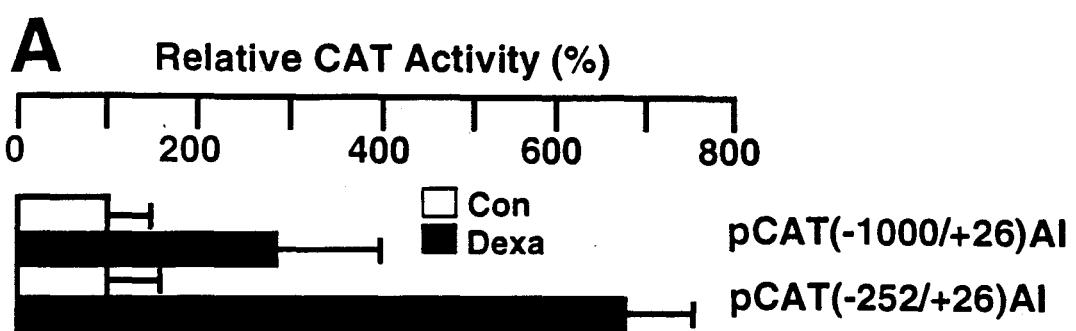


Fig.7 Saladin et al.

**pCAT(-252/+26)AI**      **MMTV-LTR-CAT**

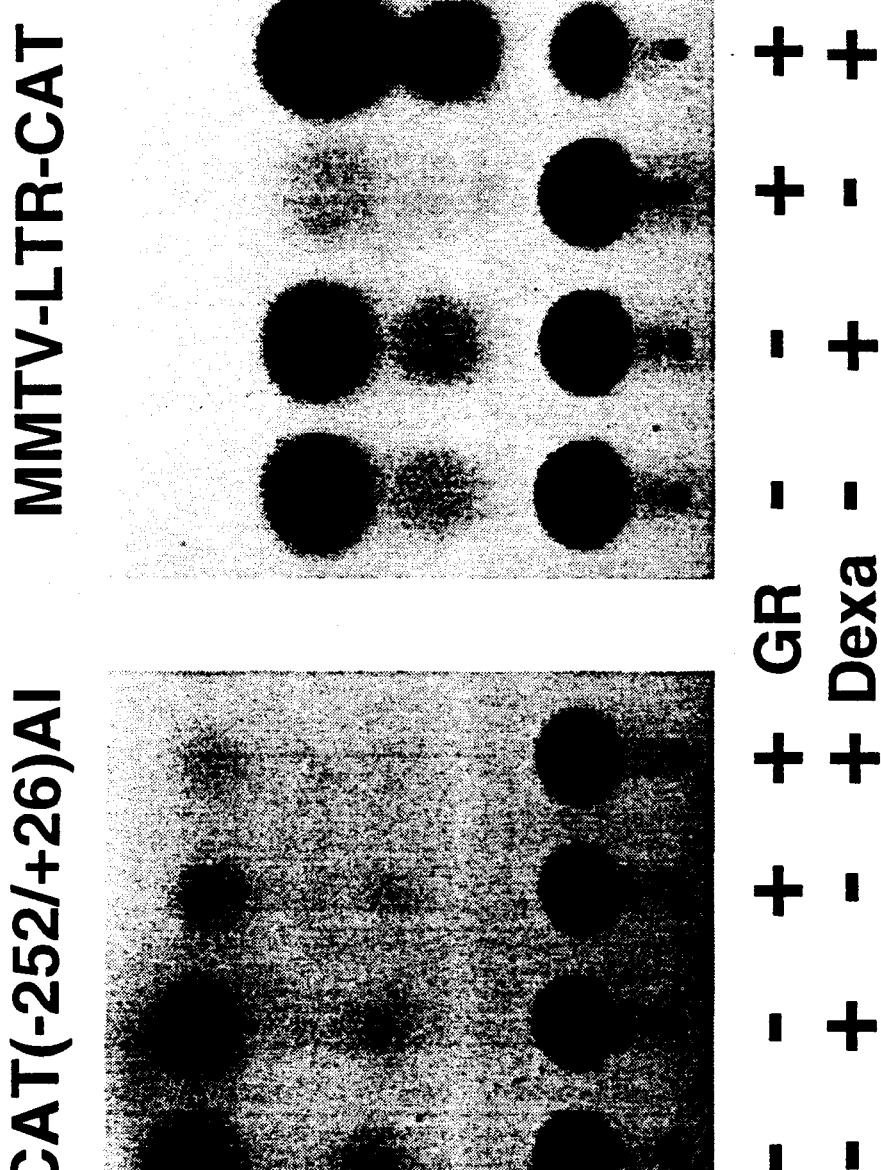
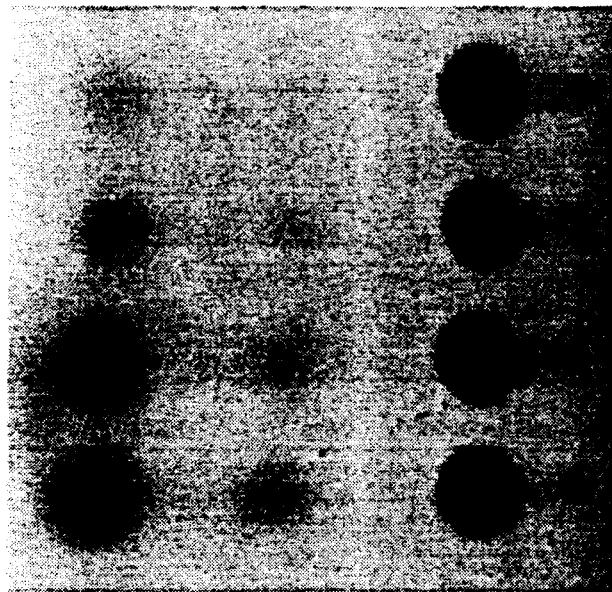


Fig.8 Saladin *et al.*

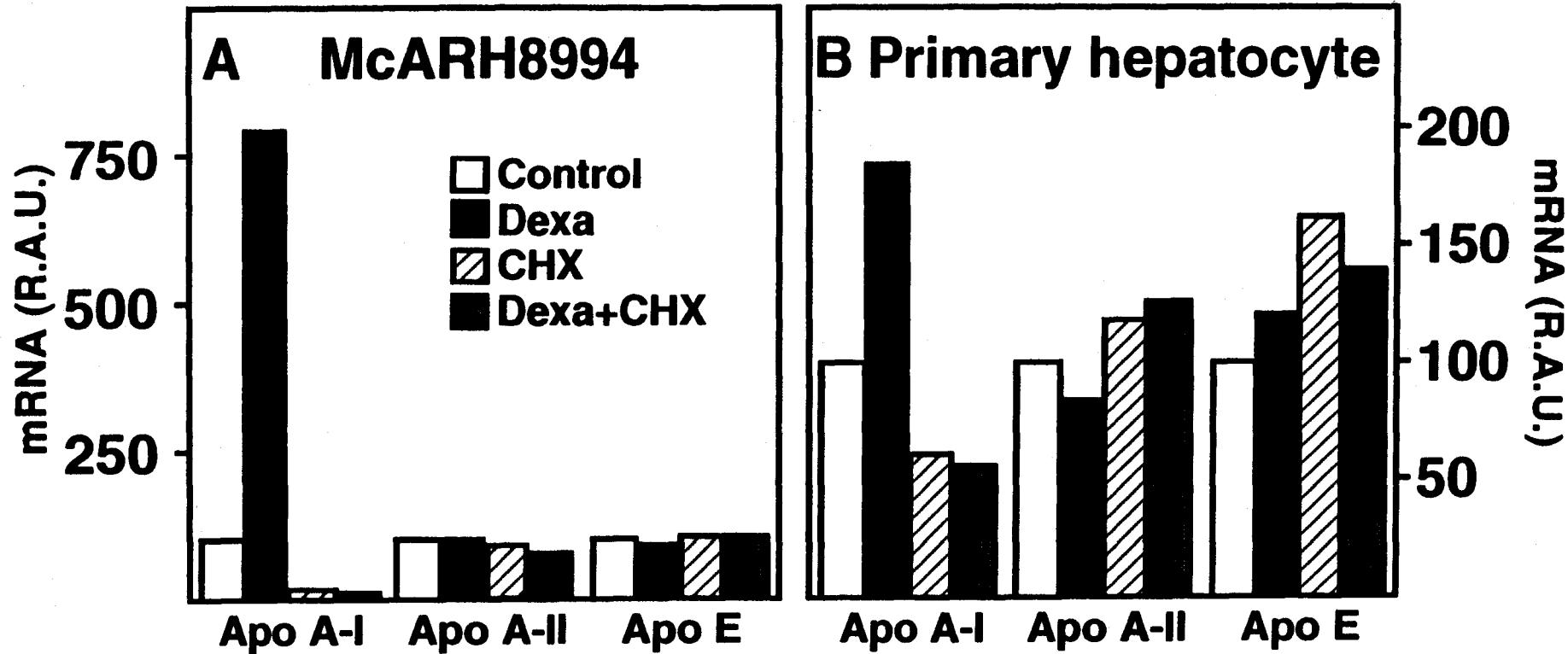


Fig.9 Saladin et al.

## PUBLICATION II

REGULATION OF RAT LIVER APOLIPOPROTEIN A-I,  
APOLIPOPROTEIN A-II AND ACYL-COENZYME A  
OXIDASE GENE EXPRESSION BY FIBRATES  
AND DIETARY FATTY ACIDS

Régis Saladin, Laurence Berthou, Parveen Yaqoob,  
Didier Branellec, Philip Calder, Jean-Charles Fruchart,  
Patrice Denèfle, Johan Auwerx, et Bart Staels

Eur. J. Biochem., 1995, 232, 179-187

## Regulation of rat liver apolipoprotein A-I, apolipoprotein A-II and acyl-coenzyme A oxidase gene expression by fibrates and dietary fatty acids

Laurence BERTHOU<sup>2</sup>, Régis SALADIN<sup>1</sup>, Parveen YAQOOB<sup>3</sup>, Didier BRANELLEC<sup>2</sup>, Philip CALDER<sup>3</sup>, Jean-Charles FRUCHART<sup>1</sup>, Patrice DENÈFLE<sup>2</sup>, Johan AUWERX<sup>1</sup> and Bart STAELS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biologie des Régulations chez les Eucaryotes, INSERM U.325, Département d'Athérosclérose, Institut Pasteur, Lille, France

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Rhône-Poulenc Rorer SA, Vitry sur Seine, France

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, University of Oxford, Oxford, England

(Received 12 May 1995) – EJB 95 0760/1

The regulation by fibrates and dietary fatty acids of the hepatic gene expression of apolipoproteins (apo) A-I and A-II, the major protein constituents of high-density lipoproteins, as well as of acyl-CoA oxidase, the rate-limiting enzyme of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway, was studied *in vivo* in the rat and *in vitro* in primary cultures of rat hepatocytes. In primary hepatocytes, different fibrates decreased apo A-I and increased acyl-CoA oxidase mRNA levels, whereas apo A-II mRNA only decreased in level after treatment with fenofibric acid, but not after bezafibrate, gemfibrozil or Wy-14643 treatment. Treatment with fenofibric acid counteracted the increase in apo A-I mRNA levels observed after dexamethasone or all-*trans* retinoic acid treatment, whereas simultaneous addition of fenofibric acid together with all-*trans* retinoic acid or dexamethasone resulted in a superinduction of acyl-CoA oxidase mRNA. Addition of the *n*-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), docosanohexaenoic acid and eicosapentaenoic acid, or the fatty acid derivative  $\alpha$ -bromopalmitate, decreased apo A-I and increased acyl-CoA oxidase mRNA in a dose-dependent and time-dependent manner, whereas apo A-II mRNA did not change significantly. Nuclear run-on experiments demonstrated that fenofibric acid and  $\alpha$ -bromopalmitate decreased apo A-I and increased acyl-CoA oxidase gene expression at the transcriptional level. When rats were fed isocaloric diets enriched in saturated fat (hydrogenated coconut oil), *n*-6 PUFAs (safflower oil) or *n*-3 PUFAs (fish oil), a significant decrease in liver apo A-I and apo A-II mRNA levels was only observed after fish oil feeding. Compared to feeding low fat, liver acyl-CoA oxidase mRNA increased after fat feeding, but this effect was most pronounced (twofold) in rats fed fish oil. Results from these studies indicate that fish oil feeding reduces rat liver apo A-I and apo A-II gene expression, similar to results obtained after feeding fenofibrate. Fibrates and *n*-3 fatty acids (and the fatty acid derivative,  $\alpha$ -bromopalmitate) down-regulate apo A-I and induce acyl-CoA oxidase gene expression through a direct transcriptional action on the hepatocyte. In contrast, only fenofibric acid, but not the other fibrates or fatty acids tested, decrease apo A-II gene expression *in vitro*.

**Keywords:** fibrates; fatty acids; apolipoprotein; liver; gene expression.

Elevated plasma triacylglyceride and low-density lipoprotein cholesterol concentrations, accompanied by reduced high-density lipoprotein (HDL) levels, are associated with an increased risk of atherosclerosis. Plasma lipid and lipoprotein concentrations depend on the interaction of the genetic background with environmental factors, such as dietary changes and pharmacological interventions. For instance, lowering the total fat intake or increasing the ratio of unsaturated to saturated fat reduces plasma triacylglyceride and cholesterol concentrations in humans [1–12] (for review, see [13, 14]). A very similar lipid-lowering profile is obtained after pharmacological treatment

Correspondence to B. Staels, L. B. R. E., INSERM U.325, Département d'Athérosclérose, Institut Pasteur, 1, rue du Prof. Calmette, F-59019 Lille Cédex, France

Fax: +33 20 877360.

**Abbreviations:** Apo, apolipoprotein; GraP-DH, glyceraldehydephosphate dehydrogenase; HDL, high-density lipoprotein; PPAR, peroxisome-proliferator-activated receptor; PPRE, peroxisome-proliferator-response element; PUFA, polyunsaturated fatty acid; RXR, 9-cis retinoic acid receptor.

**Enzyme:** Acyl-CoA oxidase (EC 1.3.3.6).

**Note:** L. Berthou and R. Saladin contributed equally to this work.

with fibrates, a class of widely used hypolipidemic drugs [15]. Interestingly, administration of fibrates to rodents induces peroxisomal  $\beta$ -oxidation, leading to peroxisome proliferation, which results in hepatomegaly [16–19]. In analogy, feeding rodents a high-fat diet can also provoke a similar peroxisome proliferation [20–22]. The parallel effects of fatty acids and fibrates on hepatic lipid metabolism therefore suggest a common mechanism of action of these dietary and pharmacological factors.

Recently, a group of transcription factors belonging to the superfamily of nuclear hormone receptors have been identified [23, 24]. These receptors, called peroxisome-proliferator-activated receptors (PPARs), are activated by peroxisome proliferators, a heterogeneous group of chemicals, including fibrates and various fatty acids [25, 26]. After activation, PPARs bind to response elements termed peroxisome-proliferator-response elements (PPREs), in the regulatory sequences of target genes, such as acyl-CoA oxidase, the rate-limiting enzyme in the pathway of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation of fatty acids, and regulate their transcription [27, 28]. It is, therefore, conceivable that activation of PPARs also leads to alterations in the transcription of specific genes involved in lipoprotein metabolism, and thus constitutes a

common link through which dietary factors, such as fatty acids, and pharmacological agents, such as fibrates, affect plasma cholesterol and triacylglyceride concentrations.

In view of the effects of peroxisome proliferators on the expression of certain intracellular enzymes [16, 29, 30], we initiated studies to determine whether fibrates also modify the expression of genes coding for secreted proteins involved in lipoprotein metabolism, such as the different apolipoproteins. In a previous report [31], we demonstrated that administration of fibrates to rats *in vivo* resulted in a tissue-specific down-regulation of liver apoprotein (apo) A-I and apo A-II gene expression. Given the crucial role of these apolipoproteins in plasma HDL metabolism, we initiated more detailed studies to elucidate the cellular mechanisms underlying their regulation using primary cultures of adult rat hepatocytes. Our results demonstrate that different fibrates and fatty acids, such as docosanoheaxenoic acid, eicosanopentaenoic acid and  $\alpha$ -bromopalmitate, act on the hepatocyte by down-regulating apo A-I expression at the transcriptional level, whereas apo A-II expression is reduced only by fenofibrate, but not by the other fibrates and fatty acids tested. In contrast, *in vivo* administration of fish oil an *n*-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA), but not an *n*-6 PUFA (safflower oil) or a saturated fat (coconut oil) results in marked repression of both apo A-I and apo A-II mRNA levels. These data suggest that fibrates and dietary *n*-3 fatty acids regulate rat liver apo A-I expression, but not apo A-II expression, through a common transcriptional mechanism. In addition, the qualitatively distinct effects of various fibrates on apo A-II gene expression may, at least partially, explain their differential effects on plasma HDL concentrations.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** Fenofibric acid was synthesized at Rhône-Poulenc Rorer Ltd. Fenofibrate, clofibrate, bezafibrate, gemfibrozil, dexamethasone, docosanoheaxenoic acid (22:6 *n*-3), eicosanopentaenoic acid (20:5 *n*-3) and all-trans retinoic acid were purchased from Sigma Chemical Co.; pirixinic acid (Wy-14643) was from Chemsyn Science Laboratories and  $\alpha$ -bromopalmitate was from Aldrich. Animal diets were provided by ICN Biomedicals.

**Animals and treatments.** Adult male rats received either a standard low-fat rat chow or a high-fat diet containing 20% hydrogenated coconut oil, safflower oil or menhaden (fish) oil for 3 months, as described [32]. The high-fat diets were all iso-caloric. At the end of the experiments, animals were fasted overnight and killed by exsanguination under ether anesthesia. Livers were removed immediately and frozen in liquid nitrogen. Plasma was used for determination of malondialdehyde and vitamin E concentrations.

**Determination of plasma malondialdehyde and vitamin E concentrations.** Plasma malondialdehyde concentrations were determined as described by Niehaus and Samuelsson [33]. Briefly, an aliquot of plasma was mixed with 2 vol. reagent (15% by vol. trichloroacetic acid, 0.375% mass/vol. thiobarbituric acid and 0.25 M hydrochloric acid) and heated in a boiling water bath for 15 min. After cooling and centrifugation (1000  $\times g$  for 10 min), the absorbance was measured at 535 nm using appropriate blanks. The malondialdehyde concentration was calculated using a molar absorption coefficient of  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . To measure vitamin E concentrations, plasma was treated and extracted as described by Desai [34] prior to separation and quantification of  $\alpha$ -tocopherol by HPLC as described by Buttriss and Diplock [35].

**Isolation and culture of rat hepatocytes.** Rat hepatocytes were isolated by collagenase perfusion [36] of livers from male

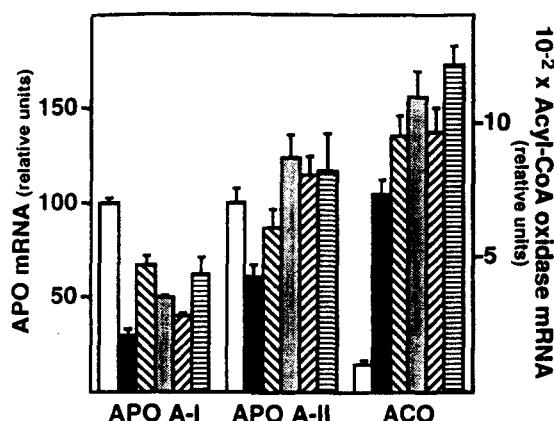
rats of mass between 150–250 g (cell viability higher than 85% by the Trypan Blue exclusion test). The hepatocytes were cultured in monolayer ( $1.5 \times 10^5$  cells/cm $^2$ ) in Leibovitz-15 medium (Gibco/BRL) supplemented with fetal calf serum (10% by vol.), fatty-acid-free BSA (0.2% mass/vol.), NaHCO<sub>3</sub> (26 mM), L-glutamine (2 mM), glucose (3 g/l) and antibiotics, at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. For experiments with the natural fatty acids, docosanoheaxenoic acid and eicosanopentaenoic acid, medium was supplemented with 10% fetal calf serum delipoproteinized by ultracentrifugation in KBr (1.21 g/ml) followed by treatment with AG-1-X8 resin (Bio-Rad) plus activated charcoal to eliminate all endogenous fatty acids. Dexamethasone (0.1  $\mu\text{M}$ ; in ethanol) or all-trans retinoic acid [10  $\mu\text{M}$ ; in (Me)<sub>2</sub>SO] were added to the culture medium where indicated. Treatments with fenofibric acid [in (Me)<sub>2</sub>SO] or different fatty acids (in ethanol) at the indicated doses and periods of time were started immediately after seeding. Control cells received vehicle only at 0.1%, by vol., final concentration in culture medium. No morphological differences in cell adhesion or cell toxicity (determined by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide colorimetric test [37]) were observed between control and treated rat hepatocytes. At the end of the experiments, medium was removed, cells were washed three times with ice-cold 0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate, pH 7.2 (NaCl/P<sub>i</sub>) and solubilized by addition of 1 ml of 4 M guanidinium isothiocyanate. All experiments were performed at least twice.

**RNA analysis.** Total cellular RNA was prepared by the acid guanidinium thiocyanate/phenol/chloroform method [38]. Northern and dot-blot hybridizations of total cellular RNA were performed as described [31]. Rat apo A-I, apo A-II and acyl-CoA oxidase cDNA clones were used as probes [19, 31]. A glyceraldehydephosphate dehydrogenase (GraP-DH) cDNA clone was used as a control probe [39]. All probes were labeled by random-primed labeling (Boehringer Mannheim). Filters were hybridized to  $1.5 \times 10^6$  cpm/ml each probe as described [31]. They were washed once in 500 ml 75 mM NaCl, 7.5 mM sodium citrate and 0.1% SDS for 10 min at room temperature and twice for 30 min at 65°C and subsequently exposed to X-ray film (X-OMAT-AR, Kodak). Autoradiograms were analyzed by quantitative scanning densitometry (Biorad GS670 Densitometer) as described [31].

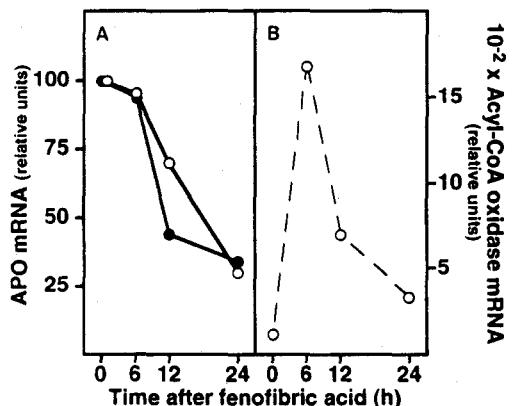
**Isolation of nuclei and transcriptional rate assay.** Nuclei were prepared from primary rat hepatocytes treated for 9 h with fenofibric acid (500  $\mu\text{M}$ ),  $\alpha$ -bromopalmitate (50  $\mu\text{M}$ ) or vehicle, and transcription run-on assays were performed as described by Nevins [40]. Equivalent counts of nuclear RNA labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (3000 Ci/mmol) were hybridized for 36 h at 42°C to 5  $\mu\text{g}$  rat apo A-I cDNA, rat acyl-CoA oxidase cDNA [19], albumin cDNA and vector DNA immobilized on Hybond-C Extra filters (Amersham). After hybridization, filters were washed at room temperature for 10 min in 75 mM NaCl, 7.5 mM sodium citrate and 0.1% SDS and twice for 30 min at 65°C, and subsequently exposed to X-ray film (X-OMAT-AR, Kodak). Quantitative analysis was performed by scanning densitometry (BioRad GS670 densitometer).

## RESULTS

In a previous report, we demonstrated that apo A-I and apo A-II mRNA levels decrease after *in vivo* treatment of adult rats with fenofibrate [31]. To investigate the mechanism of action of fibrates on apo A-I and apo A-II gene expression at the cellular level, primary cultures of adult rat hepatocytes were treated with different fibrates. Since fibrates are potent peroxisome prolifera-



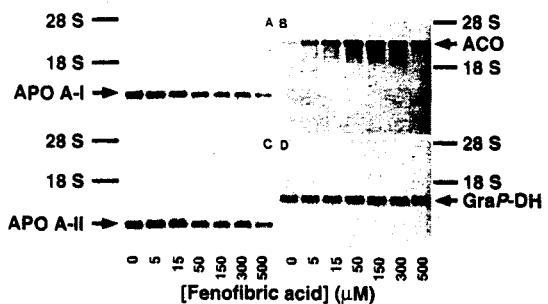
**Fig. 1.** Influence of different fibrates on apo A-I, apo A-II and acyl-CoA oxidase mRNA levels in primary rat hepatocytes. Rat hepatocytes were isolated, treated for 24 h with fenofibric acid (500 µM; ■), clofibrate (500 µM; ▨), bezafibrate (500 µM; ▨), gemfibrozil (500 µM; ▨), Wy-14643 (100 µM; ▨) or vehicle (Control; □) as described in Materials and Methods. Total cellular RNA was extracted and apo A-I, apo A-II and acyl-CoA oxidase (ACO) mRNA levels were measured by dot-blot analysis. Values represent the mean  $\pm$  SD of three replicates and are expressed in relative units taking the controls as 100%.



**Fig. 2.** Time-dependent effects of fenofibric acid on apo A-I, apo A-II and acyl-CoA oxidase mRNA levels in primary cultures of adult rat hepatocytes. Isolated rat hepatocytes were treated with fenofibric acid (500 µM) for the indicated periods of time and apo A-I (A; ●—●), apo A-II (A; ○—○) and acyl-CoA oxidase (B; ○—○) mRNA levels were quantified as described in Materials and Methods. Values are expressed relative to the vehicle-treated controls taken as 100%.

tors in rodents [16, 17, 19], the expression of the rate-limiting enzyme of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway, acyl-CoA oxidase, was also studied. Treatment of primary rat hepatocytes for 24 h with the active form of fenofibrate, fenofibric acid (500 µM), or the other fibrates clofibrate (500 µM), bezafibrate (500 µM), gemfibrozil (500 µM) and Wy-14643 (100 µM) resulted in a significant decrease in apo A-I and an increase in acyl-CoA oxidase mRNA levels (Fig. 1). Apo A-II mRNA levels decreased only after treatment with fenofibric acid (Fig. 1).

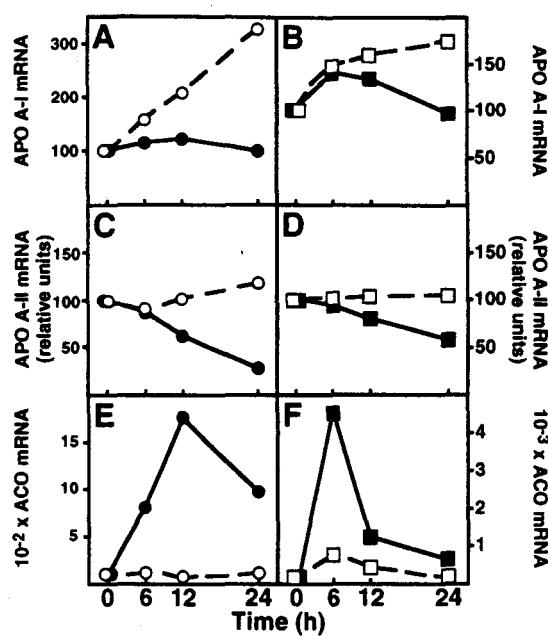
Since the effects of fenofibric acid were most pronounced, more detailed time-course and dose/response experiments with fenofibric acid were performed. When primary hepatocytes were treated with fenofibric acid (500 µM), apo A-I and apo A-II mRNA decreased after 12 h, both mRNA levels remaining low thereafter (Fig. 2A). In contrast, acyl-CoA oxidase expression exhibited different kinetics; acyl-CoA oxidase mRNA was al-



**Fig. 3.** Dose-dependent effects of fenofibric acid on apo A-I, apo A-II, GraP-DH and acyl-CoA oxidase mRNA levels in primary cultures of adult rat hepatocytes. Adult rat hepatocytes were isolated, treated for 24 h with the indicated doses of fenofibric acid and RNA was extracted as described in Materials and Methods. Total RNA (10 µg) was subjected to electrophoresis, transferred to a nylon membrane and hybridized consecutively to labeled apo A-I (A), apo A-II (C), acyl-CoA oxidase (ACO; B) or GraP-DH (D) cDNA as described in materials and methods. The position of the 18S and 28S rRNA bands are indicated.

ready maximally induced within 6 h (15-fold), whereas after 12 h and 24 h, acyl-CoA oxidase mRNA was only sevenfold and threefold higher than control levels (Fig. 2B). Treatment with fenofibric acid provoked a dose-dependent decrease in apo A-I and apo A-II mRNA, and an increase in acyl-CoA oxidase mRNA levels. Apo A-I mRNA concentrations decreased slightly (73% of control) at the lowest dose tested (5 µM), dropped below 50% of the control concentration at a dose of 50 µM, reaching a minimum at the highest dose (500 µM) tested (Fig. 3A). Apo A-II mRNA started to decrease at 15 µM fenofibric acid and dropped to less than 50% of the control levels at a dose of 500 µM (Fig. 3C). In contrast, acyl-CoA oxidase mRNA increased at 5 µM fenofibric acid and reached maximum levels at a concentration of 150 µM (Fig. 3B). GraP-DH mRNA levels remained constant upon treatment with different doses of fenofibric acid (Fig. 3D).

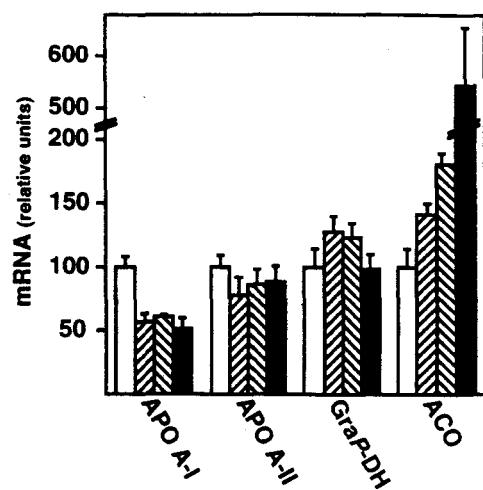
We and others have previously demonstrated that glucocorticoids and retinoids modulate apolipoprotein gene expression [41–45]. Fibrates have been shown to be potent activators of PPARs [25, 26] which, upon heterodimerization with the 9-cis retinoic acid receptor, activate the transcription of target genes [26]. In primary hepatocytes, PPAR expression is induced by corticosteroids [46]. Therefore, the interactive effects of fenofibric acid, corticosteroids and all-trans retinoic acid on the regulation of apo A-I, apo A-II and acyl-CoA oxidase gene expression was analyzed. Addition of dexamethasone to the cell culture medium resulted in a specific and time-dependent induction of apo A-I mRNA, whereas apo A-II and acyl-CoA oxidase mRNA levels remained unchanged (Fig. 4, A, C and E). Simultaneous administration of fenofibric acid prevented the induction of apo A-I mRNA by dexamethasone completely, and, as expected, apo A-II mRNA decreased (Fig. 4, A and C). In contrast, simultaneous treatment with dexamethasone and fenofibric acid resulted in a more pronounced and sustained induction of acyl-CoA oxidase gene expression (compare Fig. 4E and Fig. 2B). This marked superinduction was highly reproducible, since it was observed in several independent experiments (not shown). Treatment with all-trans retinoic acid specifically induced apo A-I, but not apo A-II mRNA levels in primary rat hepatocytes, confirming our previous observations [45]. Simultaneous treatment with fenofibric acid attenuated the induction of apo A-I mRNA by all-trans retinoic acid within 12 h, whereas apo A-II mRNA induction decreased (Fig. 4B and D). Acyl-CoA oxidase mRNA exhibited different kinetics of regulation: treatment with all-trans retinoic acid alone resulted in a rapid induction after 6 h



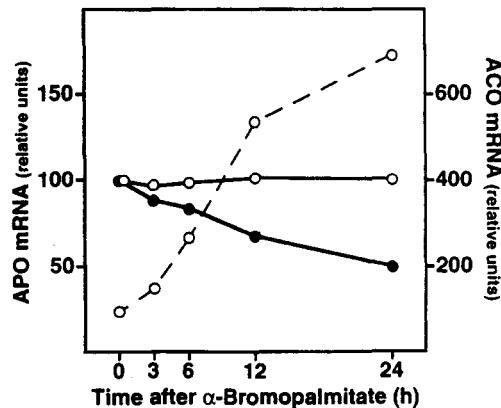
**Fig. 4.** Fenofibric acid counteracts the induction of apo A-I mRNA by dexamethasone and all-trans retinoic acid, whereas fenofibric acid superinduces acyl-CoA oxidase mRNA in the presence of dexamethasone and all-trans retinoic acid. Isolated rat hepatocytes were treated for the indicated periods of time with dexamethasone ( $1 \mu\text{M}$  in ethanol; A, C and E) or all-trans retinoic acid [ $10 \mu\text{M}$  in  $(\text{Me})_2\text{SO}$ ; B, D and F] in combination with fenofibric acid ( $500 \mu\text{M}$ ) on its vehicle  $(\text{Me})_2\text{SO}$ . Apo A-I (A and B), apo A-II (C and D) and acyl-CoA oxidase (ACO; E and F) mRNA levels were quantified as described in Materials and Methods. Values are compared to untreated controls at 0, 6, 12 and 24 h taken as 100% [dexamethasone +  $(\text{Me})_2\text{SO}$ , ○—○; dexamethasone + fenofibric acid, ●—●; all-trans retinoic acid +  $(\text{Me})_2\text{SO}$ , □—□; all-trans retinoic acid + fenofibric acid, ■—■].

(sevenfold over the control induction level), decreasing rapidly thereafter but remaining fourfold and twofold higher than control levels at 12 h and 24 h, respectively (Fig. 4F; note the different scale of the y-axis). The simultaneous addition of fenofibric acid and all-trans retinoic acid resulted in a marked superinduction of acyl-CoA oxidase mRNA, being on average twofold higher compared to the superinduction by fenofibric acid alone (compare Fig. 2A and Fig. 4F). These data indicate that all-trans retinoic acid and fenofibric acid act synergistically on acyl-CoA oxidase and opposingly on apo A-I gene expression, thereby suggesting that different regulatory mechanisms operate on acyl-CoA oxidase and apo A-I gene expression.

In addition to fibrates, different synthetic and natural fatty acids, especially polyunsaturated fatty acids, have been shown to be potent activators of PPARs and it has, therefore, been suggested that fatty acids or their metabolites are the natural ligands/activators of these receptors [25, 26]. Therefore, the effects of different fatty acids on apo A-I, apo A-II and acyl-CoA oxidase gene regulation were studied in primary cultures of rat hepatocytes. Addition of the polyunsaturated fatty acids ( $100 \mu\text{M}$ ), docosanoheaxenoic acid or eicosanopentaenoic acid, as well as  $\alpha$ -bromopalmitate, a non-oxidizable analogue of palmitate [47], for 24 h to cell culture medium, decreased apo A-I mRNA to approximately 50% of control levels, whereas apo A-II mRNA remained fairly constant (Fig. 5). All three fatty acids induced acyl-CoA oxidase mRNA levels, but to different extents; a small, but significant increase was seen after treatment with docosanoheaxenoic acid, whereas a more pronounced induction was observed with eicosanopentaenoic acid (Fig. 5).  $\alpha$ -bromopalmitate, however, was the most potent activator of



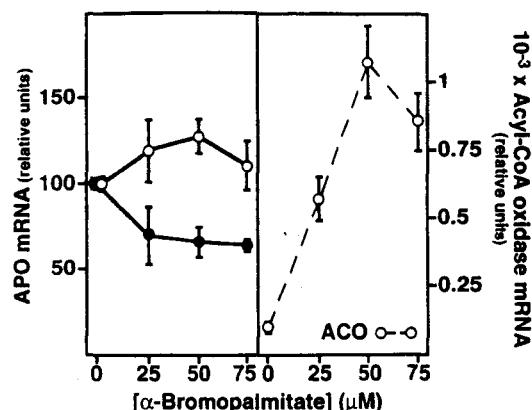
**Fig. 5.** Influence of fatty acids on apo A-I, apo A-II and acyl-CoA oxidase mRNA levels in primary rat hepatocytes. Rat hepatocytes were isolated, treated for 24 h with docosanoheaxenoic acid ( $100 \mu\text{M}$ ; △), eicosanopentaenoic acid ( $100 \mu\text{M}$ ; ▨),  $\alpha$ -bromopalmitate ( $100 \mu\text{M}$ ; ■) or vehicle (ethanol; □) as described in Materials and Methods. Total cellular RNA was extracted and apo A-I, apo A-II, GrapDH and acyl-CoA oxidase (ACO) mRNA levels were measured by dot-blot analysis. Values represent the mean  $\pm$  SD of three replicates and are expressed in relative units, taking the controls as 100%.



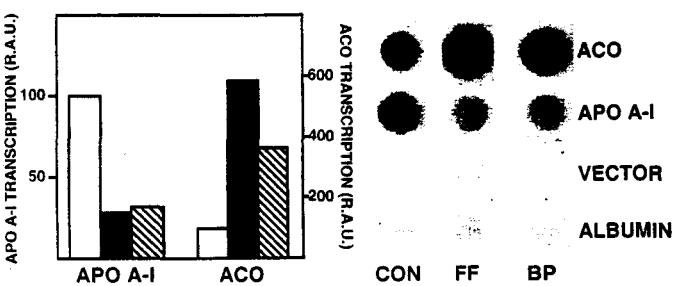
**Fig. 6.** Time-dependent effects of  $\alpha$ -bromopalmitate on apo A-I, apo A-II and acyl-CoA oxidase mRNA levels in primary rat hepatocytes. Isolated rat hepatocytes were treated with  $50 \mu\text{M}$   $\alpha$ -bromopalmitate for the indicated periods of time and apo A-I (●—●), apo A-II (○—○), and acyl-CoA oxidase (○—○) mRNA levels were quantified as described in Materials and Methods. Values are expressed relative to the vehicle-treated controls taken as 100%.

acyl-CoA oxidase gene expression, inducing acyl-CoA oxidase mRNA levels more than fivefold over those of the control (Fig. 5).

Since the effects were most pronounced with  $\alpha$ -bromopalmitate, time-course and dose/response experiments were performed using this fatty acid analogue. Treatment with  $\alpha$ -bromopalmitate decreased apo A-I mRNA levels after 6 h and a further decrease was observed 12–24 h after treatment (Fig. 6). In contrast, acyl-CoA oxidase mRNA increased after 6 h and reached maximal levels 12–24 h after  $\alpha$ -bromopalmitate treatment (Fig. 6). The effects of  $\alpha$ -bromopalmitate on apo A-I and acyl-CoA oxidase mRNA levels were already evident at a dose of  $25 \mu\text{M}$  and maximal at  $50 \mu\text{M}$   $\alpha$ -bromopalmitate (Fig. 7). In contrast to treatment with fenofibric acid, treatment with  $\alpha$ -bromopalmitate again did not reduce apo A-II mRNA levels (Figs 6 and 7).



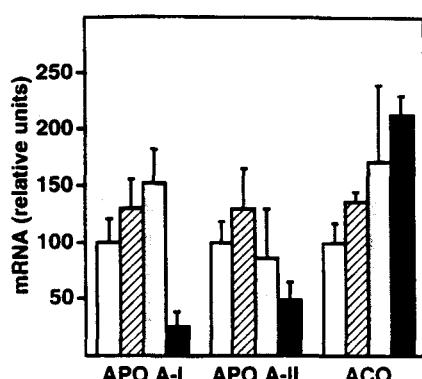
**Fig. 7.** Dose-dependent effects of  $\alpha$ -bromopalmitate on apo A-I, apo A-II and acyl-CoA oxidase mRNA levels in primary rat hepatocytes. Adult rat hepatocytes were isolated, treated for 24 h with the indicated doses of  $\alpha$ -bromopalmitate, then RNA was extracted and apo A-I (●—●), apo A-II (○—○) and acyl-CoA oxidase (○—○) mRNA levels were quantified as described in Materials and Methods. Values represent the mean  $\pm$  SD of three replicates and are expressed relative to the vehicle-treated controls, taken as 100%.



**Fig. 8.** Fenofibrate and  $\alpha$ -bromopalmitate regulate apo A-I and acyl-CoA oxidase (ACO) gene expression at the transcriptional level. Nuclear run-on assays were performed on adult rat hepatocytes treated for 9 h with fenofibric acid (500  $\mu$ M; FF, ■),  $\alpha$ -bromopalmitate (50  $\mu$ M; BP; ▨) or vehicle (□) as described in Materials and Methods.

To analyze whether the effects of fibrates and fatty acids on apo A-I and acyl-CoA oxidase expression were at the level of transcription, nuclear run-on experiments were performed. Treatment of primary hepatocytes for 9 h with fenofibric acid (500  $\mu$ M) or  $\alpha$ -bromopalmitate (50  $\mu$ M) decreased apo A-I transcription to 29% and 31%, respectively, of the control level, whereas acyl-CoA oxidase transcription was induced fivefold and threefold, respectively (Fig. 8), levels which correlate well with the changes in their respective steady-state mRNA concentrations (Figs 2 and 6).

Finally, we investigated whether a similar regulation of apo A-I and acyl-CoA oxidase gene expression occurred *in vivo* when rats were fed diets enriched in *n*-3 fatty acids. Rats were treated for 3 months with diets enriched in fish oil, which contains *n*-3 PUFAs, mainly docosanohexaenoic acid and eicosanopentaenoic acid, and its effects were compared both to isocaloric diets enriched in *n*-6 PUFAs (safflower oil) or saturated fats (hydrogenated coconut oil) as well as to the standard low-fat diet. The fish-oil-enriched diet decreased hepatic apo A-I mRNA levels to less than 20% of the levels observed in low-fat-fed rats (Fig. 9); similar to levels observed after fenofibrate treatment [31]. A quantitatively similar decrease of apo A-I mRNA was seen within 14 days of treatment with fish oil (not shown). In contrast, both other high-fat diets did not reduce, but rather tended to increase, apo A-I mRNA levels (Fig. 9), an effect which may



**Fig. 9.** Effects of low fat, coconut, safflower and fish oil diets on rat liver apo A-I, apo A-II and acyl-CoA oxidase mRNA levels. Adult male rats received standard rat chow (low fat; □) or diets enriched with hydrogenated coconut (▨), safflower (▨) or fish oil (■) for 3 months as described in Materials and Methods. Total liver RNA was extracted and apo A-I, apo A-II and acyl-CoA oxidase (ACO) mRNA levels were measured as described in Materials and Methods. Values represent the mean  $\pm$  SD of four animals.

**Table 1.** Vitamin E and malondialdehyde compositions of the various fat diets fed.

Diet	Vitamin E	Malondialdehyde
	mg/l	μM
Low fat	9.9 $\pm$ 0.4	32.9 $\pm$ 2.0
Hydrogenated coconut oil	31.0 $\pm$ 4.1	34.9 $\pm$ 2.2
Fish oil	15.9 $\pm$ 2.0	39.0 $\pm$ 1.5
Safflower oil	14.9 $\pm$ 2.8	36.0 $\pm$ 1.3

contribute to the increase in plasma HDL concentrations observed in humans when dietary carbohydrates are replaced by dietary saturated or *n*-6 polyunsaturated fats ([14] and references therein). Plasma concentrations of malondialdehyde, an indicator of lipid peroxidation, did not show major differences between the treatment groups (Table 1). Furthermore, although plasma vitamin E concentrations were clearly highest in rats fed hydrogenated coconut oil, no difference in plasma vitamin E was observed between fish-oil-fed and safflower-oil-fed animals (Table 1). These results indicate that the fish-oil-fed animals are not subject to an excessive oxidative stress and the effects of this diet are, therefore, most likely due to the specific action of the *n*-3 PUFAs on apo A-I gene transcription.

Interestingly, when compared to rats fed a low-fat diet, coconut oil and safflower oil, liver apo A-II mRNA levels decreased only in fish-oil-treated rats to an extent similar to that seen upon treatment with fenofibrate (Fig. 9) [31]. Acyl-CoA oxidase mRNA levels tended to increase after fat feeding (Fig. 9). Although the effect was most pronounced in fish-oil-fed rats (>twofold), the induction of acyl-CoA oxidase mRNA was lower when compared to rats fed fenofibrate for 14 days (>tenfold).

## DISCUSSION

Although substituting dietary saturated fat by polyunsaturated fat results in a reduction of plasma total cholesterol and low-density-lipoprotein cholesterol concentrations in humans, a paradoxical and undesirable decrease in plasma HDL and apo

A-I is often observed [6, 9–12]. The results from this study suggest that this reduction may result from a decrease in hepatic apo A-I gene expression, since apo A-I mRNA levels are dramatically lowered in rats on diets enriched in fish oil, an effect which closely resembles the decrease observed in rats treated with fibrates [31]. These data point along the same line as a previous observation made in African green monkeys [48]. When these animals were fed a polyunsaturated-fat-containing diet, a similar reduction in liver apo A-I gene expression was observed, although the magnitude of the reduction was less pronounced [48]. This indicates that, compared to non-human primates, rats are more sensitive to repression by *n*-3 polyunsaturated fats and are, therefore, a good and relevant model system to study the mechanism of action of *n*-3 polyunsaturated fatty acids on apo A-I gene expression. This study in monkeys [48] and our present results, however, contrast a previous report showing no changes in apo A-I mRNA levels in primary hepatocytes isolated from rats fed a fish oil diet for 3 weeks [49]. These authors, however, did not measure apo A-I mRNA steady-state levels in whole liver. Furthermore, primary hepatocytes from fish oil and control rats were both supplemented with oleic acid in their study [49], which may up-regulate apo A-I expression [50]. It is, therefore, conceivable that the culture conditions used in their study conceal the effects of the fish oil diet on hepatic apo A-I gene expression.

Using primary cultures of adult rat hepatocytes, we show that the effects of fibrates and dietary fish oil on apo A-I gene expression are the result of a direct action of their active components, fenofibric acid and the *n*-3 polyunsaturated fatty acids, docosanoheaxenoic acid and eicosanopentaenoic acid, on the hepatocyte. A similar effect is observed with the non-metabolizable fatty acid derivative,  $\alpha$ -bromopalmitate. The effects of these compounds on apo A-I gene expression are, therefore, independent of changes in plasma variables, such as lipid, lipoprotein or cytokine concentrations. Both fenofibrate and  $\alpha$ -bromopalmitate act in a dose-dependent and time-dependent manner and decrease apo A-I gene expression at the transcriptional level. These observations suggest that fibrates and fatty acids, such as docosanoheaxenoic acid, eicosanopentaenoic acid and  $\alpha$ -bromopalmitate, might regulate apo A-I gene expression via a common molecular mechanism. Fibrates, docosanoheaxenoic acid, eicosanopentaenoic acid and  $\alpha$ -bromopalmitate may exert part of their effects by activating the same group of transcription factors, PPARs, which may then, in turn, shut-off rat apo A-I gene transcription. Several lines of evidence, however, argue against the exclusive involvement of PPARs in this negative regulation of apo A-I expression. First, the effects of fibrates, docosanoheaxenoic acid, eicosanopentaenoic acid and  $\alpha$ -bromopalmitate on apo A-I expression are not markedly enhanced under conditions where PPAR expression is up-regulated, e.g. by the addition of dexamethasone to the culture medium [46, 51]. In contrast, the induction of acyl-CoA oxidase gene expression by fibrates, which is known to be PPAR mediated [27, 28], is markedly enhanced when fibrates are added to hepatocytes in the presence of dexamethasone, results which confirm previous observations [52, 53]. Second, in a separate study, we reported that co-transfection of a PPAR expression vector did not enhance, but actually attenuated the repressive effect of fibrates on human apo A-I gene promoter transcription in transient transfection experiments [54]. Finally, not all PPAR activators repress apo A-I expression *in vitro* or *in vivo* in rats (this study) [50, 54]. Indeed, it is remarkable that *in vivo* treatment of rats with *n*-6 PUFA (safflower oil, this study) or monounsaturated fatty acid diets (olive oil) [50] results in increased liver apo A-I mRNA levels. Most likely, one needs to invoke alternative mechanisms to explain the reduction of apo A-I gene expression by fibrates, docosanoheaxenoic acid, eicosanopentaenoic acid and  $\alpha$ -bromopalmitate, such as the effects certain of these peroxisome proliferators have on intracellular lipid metabolism [17, 55], on eicosanoid [56], and cytokine [57] production. In addition, these agents may affect membrane fluidity [58, 59] and redox or phosphorylation states of certain proteins involved in transcriptional control [55]. Although the exact mechanism still remains to be established, fibrates and *n*-3 polyunsaturated fatty acids seem to have a repressive effect on apo A-I gene expression in rodents.

The apo A-I gene appears to belong to a category of genes, whose expression is repressed by peroxisome proliferators, such as *n*-3 polyunsaturated fatty acids and fibrates. Other examples of repressed genes are the apo C-III, the apo A-IV, the stearoyl-CoA desaturase (SCD1), the fatty acid synthase and S14 genes [60–66]. However, fibrates and dietary fats induce several enzymes involved in the intracellular metabolism and  $\beta$ -oxidation of fatty acids, such as acyl-CoA synthetase, the bifunctional enzyme and acyl-CoA oxidase [16, 29, 30], some intracellular fatty-acid-binding proteins, such as acyl-CoA-binding protein, fatty-acid-binding protein (FABP and aP2), and other proteins such as lipoprotein lipase and P450IVA1 [18, 67–72]. In this context, it is very interesting to note that the expression of several extracellular proteins involved in lipid transport, such as apo C-III, apo A-I, apo A-II and apo A-IV are all reduced by peroxisome proliferators, whereas intracellular lipid-capturing proteins (fatty-acid-binding protein, acyl-CoA-binding protein) are induced in rodents. This remarkable fact might have some physiological implications, which are still unclear. For instance, it is conceivable that, once the liver is overloaded by lipids, a negative feed-back becomes operative, decreasing the synthesis of proteins involved in the transport of these lipids to the liver.

In contrast to apo A-I, the effects of different fibrates and fatty acids on rat apo A-II gene expression are clearly distinct. Apo A-II mRNA levels decrease upon fenofibrate and fish oil treatment *in vivo*, albeit to a lesser degree than apo A-I (this study) [31]. Our previous studies indicate that fenofibrate exerts its effects on apo A-II expression at the post-transcriptional level [31], a mechanism which is clearly different from that acting on apo A-I. In contrast, liver apo A-II mRNA did not change significantly upon *in vivo* treatment with gemfibrozil, clofibrate or the dietary fats, coconut oil and safflower oil (this study) [31]. Furthermore, distinct effects of fenofibrate and other fibrates, such as bezafibrate, gemfibrozil and Wy-14643, or fatty acids such as docosanoheaxenoic acid, eicosanopentaenoic acid and  $\alpha$ -bromopalmitate, were also observed in primary cultures of hepatocytes. Addition of fenofibrate to primary hepatocytes resulted in a time-dependent and dose-dependent reduction of apo A-II mRNA. In contrast, addition of the other fibrates tested, docosanoheaxenoic acid, eicosanopentaenoic acid or  $\alpha$ -bromopalmitate to primary cultures of adult rat hepatocytes did not result in repression of apo A-II gene expression. These results suggest that the decrease in apo A-II gene expression in fish-oil-treated rats is mediated by an indirect mechanism, possibly via changes in plasma lipid, lipoprotein or cytokine concentrations. Furthermore, it is tempting to speculate that the different effects of fibrates, such as fenofibrate and gemfibrozil, on HDL concentrations both in humans and rats are, at least in part, linked to their differential effects on hepatic apo A-II production, a major factor determining plasma HDL subclasses in humans [73].

The results from this study demonstrate, to our knowledge, for the first time, that dietary addition of fish oil results in the induction of rat liver acyl-CoA oxidase gene expression. This induction may constitute a possible mechanism through which dietary fats provoke peroxisome proliferation [20–22]. Furthermore, our observations on the transcriptional induction of acyl-

CoA oxidase gene expression by fenofibric acid *in vitro* and *in vivo* and its potentiation by dexamethasone confirm and extend previous reports using peroxisome proliferators, such as the fibrates clofibrate and ciprofibrate, fatty acid derivatives such as tetradecylthioacetic acid, and chemically diverse substances such as methylclofenapate, nafenopin or mono(ethylhexyl)phthalate [16, 52, 69]. In addition, acyl-CoA oxidase mRNA levels are induced by all-*trans* retinoic acid (this study) [74] and simultaneous addition of all-*trans* retinoic acid and fenofibric acid leads to a more pronounced and prolonged induction. Since all-*trans* retinoic acid (as opposed to dexamethasone) does not alter PPAR $\alpha$  expression levels in these cells (Staels B., Lemberger T., Wahli W. and Auwerx J., unpublished observations), this synergism is most likely due to the heterodimerization of PPAR (activated by fibrates) to the 9-*cis*-retinoic acid receptor (activated by retinoids), which then cooperate to bind to the acyl-CoA-oxidase-PPRE, located in the acyl-CoA oxidase gene promoter [28]. Alternatively, it is possible that different response elements in the acyl-CoA oxidase promoter are simultaneously activated by fibrates and retinoids, thereby leading to a cumulative induction of acyl-CoA oxidase gene transcription.

In conclusion, the results from these studies indicate that (a) fibrates and fatty acids, such as docosanohexaenoic acid, icosanopentaenoic acid and  $\alpha$ -bromopalmitate, down-regulate apo A-I gene expression *in vivo* and *in vitro* at the transcriptional level, probably by a similar mechanism; (b) fibrates and all of the fatty acids tested induce liver acyl-CoA oxidase gene expression; (c) only fenofibrate and not the other fibrates and fatty acids tested, decreases apo A-II gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. *In vivo* treatment with a fish-oil-enriched diet, however, results in a decrease of liver apo A-II mRNA comparable to that observed after fenofibrate treatment. These different effects of fibrates and fatty acids on apo A-I gene expression, and on apo A-II gene expression, indicate that distinct mechanisms govern the regulation of these genes by these factors.

This research was sponsored by INSERM, by CNRS and by grants from *Fondation pour la Recherche Médicale*, ARCOL and the BioAvenir program financed by Rhône-Poulenc, *Ministère de la Recherche et de l'Espace* and *Ministère de l'Industrie et du Commerce Extérieur*. The authors thank A. Tbaikhi for excellent technical assistance.

## REFERENCES

- Ahrens, E. H., Hirsch, J. & Insull, W. (1957) The influence of dietary fats on serum lipid events in man, *Lancet* 10, 943–953.
- Chait, A., Onitiri, A., Nicole, A., Rabaya, E., Davis, J. & Lewis, B. (1974) Reduction of serum triglyceride levels by polyunsaturated fat. Studies on the mode of action and on very low-density lipoprotein composition, *Atherosclerosis* 20, 347–364.
- Von Lossowczy, T. O., Ruiter, A., Bronsegeest-Schouten, H. C., Von Gent, C. M. & Hermus, R. J. J. (1978) The effect of a fish oil diet on serum lipids in healthy subjects, *Am. J. Clin. Nutr.* 31, 1340–1346.
- Shepherd, J., Packard, C. J., Grundy, S. M., Yeshurun, D., Gotto, A. M. & Taunton, O. D. (1980) Effects of saturated and polyunsaturated fat diets on the chemical composition and metabolism of low-density lipoproteins in man, *J. Lipid Res.* 21, 91–99.
- Turner, J. D., Le, N. A. & Brown, W. V. (1981) Effect of changing dietary fat saturation on low-density lipoprotein metabolism in man, *Am. J. Physiol.* 241, E57–E63.
- Schaefer, E. J., Levy, R. I., Ernst, N. D., Van Sant, F. D. & Brewer, H. B. (1981) The effects of low cholesterol, high polyunsaturated fat, and low-fat diets on plasma lipid and lipoprotein cholesterol levels in normal and hypercholesterolemic subjects, *Am. J. Clin. Nutr.* 34, 1758–1763.
- Philipson, B. E., Rothrock, D. W., Connor, W. E., Harris, W. S. & Illingworth, D. R. (1985) Reduction of plasma lipids, lipoproteins and apoproteins by dietary fish oils in patients with hypertriglyceridemia, *N. Engl. J. Med.* 312, 1210–1216.
- Zanni, E. E., Zannis, V. I., Blum, C. B., Herbert, P. N. & Breslow, J. L. (1987) Effect of egg cholesterol and dietary fats on plasma lipids, lipoproteins, and apoproteins of normal women consuming natural diets, *J. Lipid Res.* 28, 518–527.
- Mattson, F. H. & Grundy, S. M. (1985) Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man, *J. Lipid Res.* 26, 194–202.
- Shepherd, J., Packard, C. J., Patsch, J. R., Gotto, A. M. & Taunton, O. D. (1978) Effect of dietary polyunsaturated and saturated fat on the properties of high-density lipoproteins and the metabolism of apoprotein A-1, *J. Clin. Invest.* 61, 1582–1592.
- Vega, G. L., Groszek, E., Wolf, R. & Grundy, S. M. (1982) Influence of polyunsaturated fats on composition of plasma lipoproteins and apolipoproteins, *J. Lipid Res.* 23, 811–822.
- Jackson, R. L., Kashyap, M. L., Barnhart, R. L., Allen, C., Hogg, E. & Glueck, C. J. (1984) Influence of polyunsaturated and saturated fats on plasma lipids and lipoproteins, *Am. J. Clin. Nutr.* 39, 589–597.
- Grundy, S. M. & Denke, M. A. (1990) Dietary influences on serum lipids and lipoproteins, *J. Lipid Res.* 31, 1149–1172.
- Katan, M. B., Zock, P. L. & Mensink, R. P. (1994) Effects of fats and fatty acids on blood lipids in humans, an overview, *Am. J. Clin. Nutr.* 60, 1017S–1022S.
- Sirtori, C. R. & Franceschini, G. (1988) Effects of fibrates on serum lipids and atherosclerosis, *Pharmacol. Ther.* 37, 167–191.
- Reddy, J. K., Goel, S. K., Nemali, M. R., Carrino, J. J., Laffler, T. G., Reddy, M. K., Sperbeck, S. J., Osumi, T., Hashimoto, T., Lalwani, N. D. & Rao, M. S. (1986) Transcriptional regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83, 1747–1751.
- Lock, E. A., Mitchell, A. M. & Elcombe, C. R. (1989) Biochemical Mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29, 145–163.
- Milton, M. N., Elcombe, C. R. & Gibson, G. G. (1990) On the mechanism of induction of microsomal cytochrome P450IVA1 and peroxisome proliferation in rat liver by clofibrate, *Biochem. Pharmacol.* 40, 2727–2732.
- Osumi, T., Ozasa, H. & Hashimoto, T. (1984) Molecular cloning of cDNA for rat acyl-CoA oxidase, *J. Biol. Chem.* 259, 2031–2034.
- Ishii, H., Fukumori, N., Horie, S. & Suga, T. (1980) Effects of fat content in the diet on hepatic peroxisomes of the rat, *Biochem. Biophys. Acta* 617, 1–11.
- Neat, C. E., Thomassen, S. & Osmundsen, H. (1980) Induction of peroxisomal  $\beta$ -oxidation in rat liver by high-fat diet, *Biochem. J.* 186, 369–371.
- Nilsson, A., Prydz, K., Rortveit, T. & Christiansen, E. N. (1987) Studies on the interrelated stimulation of microsomal  $\omega$ -oxidation and peroxisomal  $\beta$ -oxidation in rat liver with a partially hydrogenated fish oil diet, *Biochim. Biophys. Acta* 920, 114–119.
- Isserman, I. & Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators, *Nature* 347, 645–650.
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. & Wahli, W. (1992) Control of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors, *Cell* 68, 879–887.
- Gottlicher, M., Widmark, E., Li, Q. & Gustafsson, J. A. (1992) Fatty acids activate chimera of the clofibrate acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 4653–4657.
- Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K. & Wahli, W. (1993) Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 2160–2164.
- Osumi, T., Wen, J. K. & Hashimoto, T. (1991) Two cis-acting regulatory elements in the peroxisome proliferator-responsive element enhancer region of rat acyl-CoA oxidase gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 866–871.
- Tugwood, J. D., Isserman, I., Anderson, R. G., Bundell, K. R., McPheat, W. L. & Green, S. (1992) The mouse peroxisome-pro-

- liferator-activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene, *EMBO J.* 11, 433–439.
29. Schoonjans, K., Staels, B., Grimaldi, P. & Auwerx, J. (1993) Acyl-CoA synthetase mRNA expression is controlled by fibrin-acid derivatives, feeding and liver proliferation. *Eur. J. Biochem.* 216, 615–622.
  30. Chatterjee, B., Murty, C. V. R., Olson, M. J. & Roy, A. K. (1987) Cloning and expression of the rat liver cDNA for peroxisomal enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in  $\lambda$ GT11. *Eur. J. Biochem.* 166, 273–278.
  31. Staels, B., Van Tol, A., Andreu, T. & Auwerx, J. (1992) Fibrates influence the expression of genes involved in lipoprotein metabolism in a tissue selective manner. *Arterioscler. Thromb.* 12, 286–294.
  32. Yaqoob, P., Newsholme, E. A. & Calder, P. C. (1994) The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology* 82, 603–610.
  33. Niehaus, W. G. J. & Samuelson, B. (1968) Formation of malondialdehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *Eur. J. Biochem.* 6, 126–130.
  34. Desai, I. D. (1984) Vitamin E analysis methods for animal tissues, *Methods Enzymol.* 105, 138–147.
  35. Buttriss, J. L. & Diplock, A. J. (1984) High-performance liquid chromatography methods for vitamin E in tissues, *Methods Enzymol.* 105, 131–138.
  36. Berry, M. N. & Friend, D. S. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. Cell. Biol.* 43, 506–520.
  37. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
  38. Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single step method for RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
  39. Tokunaga, K., Nakaruma, Y., Sakata, K., Fujimori, K., Ohkubo, M., Sawada, K. & Sakiyama, S. (1987) Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. *Cancer Res.* 47, 5616–5619.
  40. Nevins, J. R. (1987) Isolation and analysis of nuclear RNA, *Methods Enzymol.* 152, 234–241.
  41. Staels, B., van Tol, A., Chan, L., Verhoeven, G. & Auwerx, J. (1991) Variable effects of different corticosteroids on plasma lipids, apolipoproteins, and hepatic apolipoprotein mRNA levels in rats, *Arterioscler. Thromb.* 11, 760–769.
  42. Rottman, J. N., Widom, R. L., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. & Karathanasis, S. K. (1991) A retinoic acid-responsive element in the apolipoprotein A-I gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3814–3820.
  43. Elshourbagy, N. A., Boguski, M. S., Liao, W. S. L., Jefferson, L. S., Gordon, J. I. & Taylor, J. M. (1985) Expression of rat apolipoprotein A-IV and A-I genes: mRNA induction during development and in response to glucocorticoids and insulin, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 82, 8242–8246.
  44. Kaptein, A., de Wit, E. C. M. & Princen, H. M. G. (1993) Retinoids stimulate apo A-I synthesis by induction of gene transcription in primary hepatocyte cultures from cynomolgus monkey (Macaca fascicularis). *Arterioscler. Thromb.* 13, 1505–1514.
  45. Berthou, L., Staels, B., Saldicco, I., Berthelot, I., Casey, J., Fruchart, J.-C., Denèfle, P. & Branellec, D. (1994) Opposite in vitro and *in vivo* regulation of hepatic apolipoprotein A-I gene expression by retinoic acid. Absence of effects on apolipoprotein A-II gene expression, *Arterioscler. Thromb.* 14, 1657–1664.
  46. Lemberger, T., Staels, B., Saladin, R., Desvergne, B., Auwerx, J. & Wahli, W. (1994) Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene by glucocorticoids, *J. Biol. Chem.* 269, 24527–24530.
  47. Kaikaus, R. M., Sui, Z., Lysenko, N., Wu, N. Y., Ortiz de Montellano, P. R., Ockner, R. K. & Bass, N. M. (1993) Regulation of pathways of extramitochondrial fatty acid oxidation and liver fatty acid-binding protein by long-chain monocarboxylic fatty acids in hepatocytes. Effect of inhibition of carnitine palmitoyltransferase I, *J. Biol. Chem.* 268, 26866–26871.
  48. Sorci-Thomas, M., Prack, M. M., Dashti, N., Johnson, F., Rudel, L. L. & Williams, D. L. (1989) Differential effects of dietary fat on the tissue-specific expression of the apolipoprotein A-I gene: relationship to plasma concentration of high-density lipoproteins, *J. Lipid Res.* 30, 1397–1403.
  49. Ribeiro, A., Mangeney, M., Cardot, P., Lorette, C., Rayssiguier, Y., Chambaz, J. & Bereziat, G. (1991) Effect of dietary fish oil and corn oil on lipid metabolism and apolipoprotein gene expression by rat liver, *Eur. J. Biochem.* 196, 499–507.
  50. Osada, J., Fernandez-Sanchez, A., Diaz-Morillo, J. L., Aylagas, H., Miro-Obradors, M. J., Ordovas, J. M. & Palacios-Alaiz, E. (1991) Hepatic expression of apolipoprotein A-I gene in rats is upregulated by monounsaturated fatty acid diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 162–168.
  51. Hermansen Steiner, H., Nebb Sorensen, H., Tugwood, J. D., Skrede, S., Spydevold, O. & Gautvik, K. M. (1994) Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells - Hormonal modulation of fatty-acid-induced transcription, *Eur. J. Biochem.* 225, 967–974.
  52. Sorensen, H. N., Hvattum, E., Paulsen, E., Gautvik, K. M., Bremer, J. & Spydevold, O. (1993) Induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase by 3-thia fatty acid, in hepatoma cells and hepatocytes in culture is modified by dexamethasone and insulin, *Biochim. Biophys. Acta* 1171, 263–271.
  53. Norrheim, L., Sorensen, H., Gautvik, K., Bremer, J. & Spydevold, O. (1990) Synergistic actions of tetradecylthioacetic acid (TTA) and dexamethasone on induction of the peroxisomal beta-oxidation and on growth inhibition of Morris hepatoma cells. Both effects are counteracted by insulin, *Biochim. Biophys. Acta* 1051, 319–323.
  54. Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Laine, B., Fruchart, J. C., Auwerx, J. & Staels, B. (1994) Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element, *J. Biol. Chem.* 269, 31012–31018.
  55. Clarke, S. D. & Jump, D. B. (1994) Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription, *Annu. Rev. Nutr.* 14, 83–98.
  56. Donadio, J. V. J. (1991) Omega-3 polyunsaturated fatty acids: a potential new treatment of immune renal disease, *Mayo Clin. Proc.* 66, 1018–1028.
  57. Endres, S., Ghorbani, R., Kelley, V. E., Georgilis, K., Lonnemann, G., van der Meer, J. W. M., Cannon, J. G., Rogers, T. S., Klempner, M. S., Weber, P. C., Schaefer, E. J., Wolff, S. M. & Dinarello, C. A. (1989) The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells, *N. Engl. J. Med.* 320, 265–271.
  58. Cartwright, I. J., Pockley, A. G., Galloway, J. H., Greaves, M. & Preston, F. E. (1985) The effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on erythrocyte membrane phospholipids, erythrocyte deformability and blood viscosity in healthy volunteers, *Atherosclerosis* 55, 267–281.
  59. Clark, W. F., Parbtani, A., Naylor, C. D., Levinton, C. M., Muirhead, N., Spanner, E., Huff, M. W., Philbrick, D. J. & Holub, B. J. (1993) Fish oil in lupus nephritis: clinical finding and methodological implications, *Kidney Int.* 44, 75–86.
  60. Staels, B., Vu-Dac, N., Kosykh, V., Saladin, R., Fruchart, J. C., Dallongeville, J. & Auwerx, J. (1995) Fibrates down-regulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal Acyl Co-enzyme A Oxidase, *J. Clin. Invest.* 95, 705–712.
  61. Staels, B., van Tol, A., Verhoeven, G. & Auwerx, J. (1990) Apolipoprotein A-IV messenger ribonucleic acid abundance is regulated in a tissue-specific manner, *Endocrinology* 126, 2153–2163.
  62. Ntambi, J. M. (1992) Dietary regulation of stearoyl-coA desaturase 1 gene expression in mouse liver, *J. Biol. Chem.* 267, 10925–10930.
  63. Shillabeer, G., Hornford, J., Forden, J. M., Wong, N. C. W. & Lau, D. C. W. (1990) Hepatic and adipose tissue lipogenic enzyme mRNA levels are suppressed by high-fat diets in the rat, *J. Lipid Res.* 31, 623–631.
  64. Landschulz, K. T., Jump, D. B., MacDougald, O. A. & Lane, M. D. (1994) Transcriptional control of the stearoyl-coA desaturase-1

- gene by polyunsaturated fatty acids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 763–768.
55. Jump, D. B., Clarke, S. D., Thelen, A. & Liimatta, M. (1994) Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids, *J. Lipid Res.* 35, 1076–1084.
56. Jump, D. B., Clarke, S. D., MacDougald, O. & Thelen, A. (1993) Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 8454–8458.
57. Staels, B. & Auwerx, J. (1992) Perturbation of developmental gene expression in rat liver by fibric acid derivatives; lipoprotein lipase and  $\alpha$ -fetoprotein as models, *Development* 115, 1035–1043.
58. Vanden Heuvel, J. P., Sterchele, P. F., Nesbit, D. J. & Peterson, R. E. (1993) Coordinate induction of acyl-CoA binding protein, fatty acid binding protein and peroxisomal beta-oxidation by peroxisome proliferators, *Biochim. Biophys. Acta* 1177, 183–190.
59. Bell, D. R. & Elcombe, C. R. (1991) Induction of acyl-CoA oxidase and cytochrome P450IVA1 RNA in rat primary hepatocyte culture by peroxisome proliferators, *Biochem. J.* 280, 249–253.
70. Tollet, P., Strömstedt, M., Froyland, L., Berge, R. K. & Gustafsson, J.-A. (1994) Pretranslational regulation of cytochrome P450A1 by free fatty acids in primary cultures of rat hepatocytes, *J. Lipid Res.* 35, 248–254.
71. Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I. & Spiegelman, B. M. (1994) mPPAR $\gamma$ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer, *Genes Dev.* 8, 1224–1234.
72. Amri, E.-Z., Bertrand, B., Ailhaud, G. & Grimaldi, P. (1991) Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression, *J. Lipid Res.* 32, 1449–1456.
73. Ikewaki, K., Zech, L. A., Kindt, M., Brewer, H. B. J. & Rader, D. J. (1995) Apolipoprotein A-II production rate is a major factor regulating the distribution of apolipoprotein A-I among HDL subclasses LpA-I and LpA-I:A-II in normolipidemic humans, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 306–312.
74. Hertz, R. & Bar-Tana, J. (1992) Induction of peroxisomal  $\beta$ -oxidation genes by retinoic acid in cultured rat hepatocytes, *Biochem. J.* 281, 41–43.

## PUBLICATION III

REGULATION OF PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED  
RECEPTOR  $\alpha$  GENE BY GLUCOCORTICOIDS

Thomas Lemberger, Bart Staels, Régis Saladin, Béatrice Desvergne,  
Johan Auwerx, et Walter Wahli

J. Biol. Chem., 1994, 269, 24527-24530

## Regulation of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor $\alpha$ Gene by Glucocorticoids\*

(Received for publication, July 7, 1994, and in revised form, July 26, 1994)

Thomas Lemberger<sup>†‡</sup>, Bart Staels<sup>†§</sup>,  
Régis Saladin<sup>†</sup>, Béatrice Desvergne<sup>†</sup>,  
Johan Auwerx<sup>†</sup>, and Walter Wahli<sup>†</sup>

From the <sup>†</sup>Institut de Biologie Animale, Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland and the <sup>‡</sup>Laboratoire de Biologie des Régulations chez les Eucaryotes, Département d'Athérosclerose, Institut Pasteur, 59019 Lille, France

This study demonstrates that the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) is regulated by glucocorticoid hormones in hepatocytes. Hydrocortisone, dexamethasone, and triamcinolone stimulated PPAR $\alpha$  mRNA synthesis in a dose-dependent manner in primary rat hepatocyte cultures. This glucocorticoid stimulation was inhibited by RU 486, a specific glucocorticoid antagonist. Moreover, in contrast to glucocorticoid hormones, the mineralocorticoid aldosterone had only a weak effect, suggesting that the hormonal stimulation of PPAR $\alpha$  was mediated by the glucocorticoid receptor. The induction was not prevented by cycloheximide treatment of the hepatocytes, indicating that it was mediated by preexisting glucocorticoid receptor. Finally, the RNA synthesis inhibitor actinomycin D abolished the stimulatory effect of dexamethasone, and nuclear run-on analysis showed an increase of PPAR $\alpha$  transcripts after hormonal induction. Thus, the PPAR $\alpha$  gene is an early response gene of glucocorticoids that control its expression at the transcriptional level.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)<sup>1</sup> belong to the nuclear hormone receptor superfamily (1). So far, three different isoforms of PPAR ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ) coded by three separate genes have been described in amphibians, rodents, and humans (2–7, 9).<sup>2</sup> Within the superfamily, the closest relatives of PPARs are revErbA $\alpha$ , E75, and the thyroid and retinoic acid receptors (1). Initially PPARs were shown to be activated by compounds that cause peroxisomal proliferation (2, 3), but more recently fatty acids were found to be potent activators of PPAR as well (10, 11). However, direct evidence that any of these substances binds directly to PPAR is currently lacking. PPAR target genes include those encoding peroxisomal en-

\* This work was supported by grants from the Swiss National Science Foundation, the Etat de Vaud, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), and the Laboratoires Fournier. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>†</sup> Contributed equally to this work.

<sup>‡</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 21-692-41-10; Fax: 21-692-41-05.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: PPAR, peroxisome proliferator-activated receptors; PCR, polymerase chain reaction; GR, glucocorticoid receptor; TR, thyroid hormone receptor.

<sup>2</sup> E. Z. Amri, F. Bonio, G. Ailhaud, and P. Grimaldi, EMBL data base, accession number L 28116.

zymes (3, 12–14), drug-metabolizing enzymes of the cytochrome P450 family (15), and enzymes that play an important role in fatty acid metabolism (1, 5, 16).

The fact that PPARs are involved in the control of several metabolic pathways indicates that they may occupy a pivotal role in metabolic and nutritional control of gene expression (1, 17). In this respect, the PPAR function in lipid metabolism is likely to be modulated by hormones, a hypothesis reinforced by our observation of 10-fold interindividual variations of PPAR $\alpha$  mRNA levels in adult rat liver.<sup>3</sup> Thus, PPAR gene expression could be modulated by different signaling pathways such as, for instance, the ones controlled by pancreatic hormones, epinephrine, and glucocorticoid hormones, which are known to be involved in regulating lipid metabolism.

We concentrated our study on glucocorticoid hormones for the following reasons. First, a classical role attributed to glucocorticoid hormones is energy mobilization in stress situations. This is partly achieved by a permissive effect on the lipolytic action of epinephrine (18), which results in an increase in plasma-free fatty acids (19). A parallel stimulation of fatty acid metabolism through glucocorticoid-dependent PPAR activation would therefore be plausible. Second, dexamethasone and fatty acids cooperate in adipocytes to induce the aP2 gene (20), which is a target gene of PPARs (5). Finally, in hepatocytes, dexamethasone and several PPAR activators (like tetracyclioacetic acid or fenofibrate) synergistically induce the acyl-CoA oxidase gene as well as other PPAR target genes (21).<sup>4</sup>

Since the PPAR $\alpha$  isoform is presently the best characterized member of the PPAR subfamily, we tested whether glucocorticoid hormones could affect PPAR $\alpha$  expression in hepatocytes. Our results demonstrate that glucocorticoids directly activate the transcription of the PPAR $\alpha$  gene in rat hepatocyte primary cultures.

### MATERIALS AND METHODS

**Cloning of the PPAR $\alpha$ , L27, and TR $\alpha$  cDNAs**—A cDNA comprising part of the D and E domains of the rat PPAR $\alpha$  was obtained by reverse transcription coupled to PCR. The first cDNA strand was synthesized from 3  $\mu$ g of rat brain total RNA using the avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Pharmacia Biotech Inc.) and the E primer (5'-TCAGTACATGCTCTGTAGATCT-3'), which hybridizes in the E domain of the rat PPAR $\alpha$ . The cDNA was then subjected to PCR amplification with the primers E and D (5'-GGTCAGGGCCGGTCATA-CTCGCGGG-3'), hybridizing in the D domain) using the Taq polymerase (Perkin-Elmer Cetus). Amplification was carried out by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 2 min, and 72 °C for 4 min, followed by an extension step at 72 °C for 7 min. The PCR reaction mixture was subsequently treated with proteinase K (22), phenol/chloroform-extracted, ethanol-precipitated, resuspended, and digested by ApaI and BglII. The resulting insert (716 nucleotides long) was purified on agarose gel and cloned into the pBluescript KS+ vector (Stratagene) digested by ApaI and BamHI to obtain the recombinant plasmid pKS+/PPAR $\alpha$ .

An L27 cDNA was obtained by reverse transcription-PCR as described above from 28  $\mu$ g of rat cortex total RNA with the upstream primer L27up (5'-GGCTGGAATTCAACCGCTATCCAG-3') and downstream primer L27do (5'-TATGGATCCTCAAACCTTGACCTTGGCCT-CC-3'). PCR conditions were: 35 cycles at 95 °C for 1 min, 50 °C for 1 min and 30 s, and 72 °C for 1 min followed by an extension step at 72 °C for 7 min. Amplification products were treated as above and then digested by BamHI and EcoRI. The insert (220 nucleotides long) was cloned into the pBluescript KS+ vector digested by BamHI and EcoRI to obtain the plasmid pKS+/L27.

<sup>3</sup> T. Lemberger, J. Auwerx, and W. Wahli, unpublished data.

<sup>4</sup> J. Auwerx and B. Staels, unpublished data.

The plasmid pRSV/TR $\alpha$ 1 (28) was cut with *Bam*H I and *Stu*I, and the fragment containing the 205 last nucleotides of the TR $\alpha$ 1 cDNA 3' end and 100 nucleotides from the vector DNA was subcloned in pSP 72 that was cut with *Bam*H I and *Eco*RV to obtain the recombinant plasmid pSP 72/TR $\alpha$ 1.

**Isolation and Culture of Rat Hepatocytes**—Hepatocytes were isolated by collagenase perfusion (23) of livers from male rats weighing between 150 and 250 g (cell viability higher than 85% by trypan blue exclusion test). The hepatocytes were seeded at a density of  $1.5 \times 10^6$  cells/cm $^2$  in Leibovitz (L)-15 medium (Life Technologies, Inc./BRL, Paisley, U.K.) supplemented with fetal calf serum (10% v/v), fatty acid-free bovine serum albumin (0.2% w/v), NaHCO<sub>3</sub> (26 mM), glutamine (2 mM), glucose (3 g/liter), and antibiotics at 37 °C in humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, 95% air. After a 4-h incubation period, the medium was replaced by serum-free medium, and treatments with the indicated compounds at the indicated concentrations were started.

**RNase Protection Assay**—The plasmid pKS+/PPAR $\alpha$  was digested by *Taq*I and the 717-base pair fragment containing the T7 promoter, and the last 287 nucleotides of the PPAR $\alpha$  insert were isolated on agarose gel. The plasmid pKS+/L27 was linearized by *Eco*RI and gel-purified. The plasmid pSP 72/TR $\alpha$ 1 was linearized with *Bgl*II and purified on agarose gel.

From the isolated fragments described above, antisense [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP-labeled riboprobes (Amersham Corp.) were synthesized using T7 RNA polymerase (Promega). Different ratios of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP to cold UTP were used: 1:20 for L27 and 1:1 for PPAR $\alpha$  and TR $\alpha$ 1. Typical specific activities were  $1 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g for L27 probe and  $2 \times 10^9$  cpm/ $\mu$ g for the PPAR $\alpha$  and TR $\alpha$ 1 probes, which allowed signal comparison with the same exposure time.

Total RNA from primary hepatocytes was prepared by the guanidinium isothiocyanate acid phenol procedure (24).

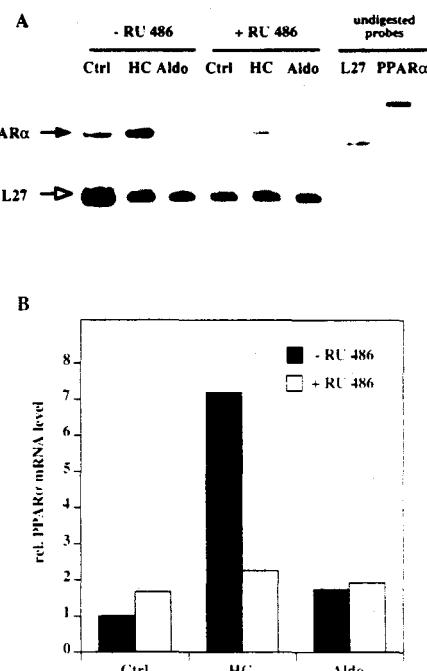
The RNase protection assay was carried out as described by Sambrook *et al.* (25). Five to 8  $\mu$ g of total RNA were hybridized either to a mixture of 10 ng of L27 riboprobe and 1 ng of PPAR $\alpha$  riboprobe or with 1 ng of the TR $\alpha$ 1 riboprobe. The amounts of the different probes were tested to be at saturating levels. Hybridization was performed at 42 °C, and digestion with RNase A (Sigma) and RNase T1 (Life Technologies, Inc.) was carried out at 30 °C with L27 and PPAR $\alpha$  probes and 15 °C with TR $\alpha$ 1. Protected fragments were separated on 6% polyacrylamide gels and revealed by exposure to x-ray films (AIF-RX, Fuji). Protected fragments are 287 nucleotides long with the PPAR $\alpha$  probe, 220 nucleotides long with the L27 probe, and 205 nucleotides long with the TR $\alpha$ 1 probe. Quantitative analysis was made with a Molecular Imager (Bio-Rad).

**Isolation of Nuclei and Transcriptional Rate Assay**—Nuclei were prepared from primary hepatocytes treated with dexamethasone ( $10^{-6}$  M) or vehicle as described by Gorski *et al.* (26). Transcription run-on assays were performed as described by Nevins (27). Equivalent amounts of labeled nuclear RNA were hybridized for 36 h at 42 °C to 5  $\mu$ g of either purified glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase cDNA (8) or purified mPPAR $\alpha$  cDNA (13) or vector DNA immobilized on Hybond-C Extra filters (Amersham Corp.). After hybridization, filters were washed at room temperature for 10 min in 0.5 × SSC and 0.1% SDS and twice for 30 min at 65 °C and subsequently exposed to x-ray film (X-OMAT-AR, Kodak). Quantitative analysis was made by scanning densitometry (Bio-Rad GF670 densitometer).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Induction of Rat PPAR $\alpha$  mRNA by Glucocorticoids**—To test the effect of glucocorticoids on PPAR $\alpha$  mRNA expression, rat hepatocytes in primary culture were treated during 6 h with  $10^{-6}$  M hydrocortisone or  $0.3 \times 10^{-6}$  M aldosterone in the presence or absence of  $10^{-6}$  M RU 486. Rat PPAR $\alpha$  mRNA was assayed by RNase protection in parallel with the mRNA of the large ribosomal subunit 27-kDa protein (L27) as a control. Hydrocortisone stimulation produced a 7-fold increase in PPAR $\alpha$  mRNA level (Fig. 1). In contrast, aldosterone, which is a pure mineralocorticoid, induced PPAR $\alpha$  mRNA only weakly. In the presence of RU 486, a specific glucocorticoid antagonist, the induction of PPAR $\alpha$  mRNA by hydrocortisone was inhibited. Taken together, these results suggest that the stimulatory effect of hydrocortisone was mediated by the glucocorticoid receptor (GR), which is indeed expressed in hepatocytes in primary culture (data not shown).

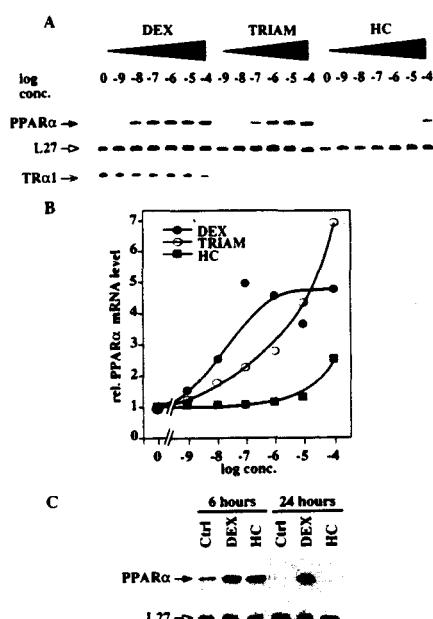
Since the hydrocortisone effect on PPAR $\alpha$  mRNA levels was mediated by the glucocorticoid receptor, we tested whether



**FIG. 1. Hydrocortisone, aldosterone, and RU 486 effects on PPAR $\alpha$  mRNA levels in rat hepatocytes.** Four hours after plating, rat hepatocytes in primary cultures were treated during 6 h with either  $10^{-6}$  M hydrocortisone (HC) or  $0.3 \times 10^{-6}$  M aldosterone (Aldo) or vehicle (Ctrl). When indicated, RU 486 was added at the concentration of  $10^{-6}$  M. A, PPAR $\alpha$  and L27 mRNAs were detected by RNase protection using 5  $\mu$ g of total RNA. PPAR $\alpha$  and L27 protected fragments are indicated (arrows). B, corresponding diagram showing the quantification of PPAR $\alpha$  mRNA levels. PPAR $\alpha$  values were normalized to those of L27. The value of the control lane without RU 486 (Ctrl, -RU 486) was arbitrarily set to 1.

other glucocorticoid steroids would also have a stimulatory action on PPAR $\alpha$  mRNA expression. Thus, we carried out a dose-response experiment with the two synthetic analogs dexamethasone and triamcinolone, as well as with hydrocortisone. Hepatocytes were treated for 24 h with hormone concentrations ranging from  $10^{-9}$  to  $10^{-4}$  M (Fig. 2, A and B). PPAR $\alpha$  mRNA expression gradually increased with both the dexamethasone and triamcinolone concentration. Hydrocortisone gave almost no response up to  $10^{-6}$  M and only a weak one at  $10^{-4}$  M (2.8-fold). This may reflect a shorter half-life of hydrocortisone relative to the more stable glucocorticoid agonists dexamethasone and triamcinolone. Indeed, hydrocortisone and dexamethasone inductions are comparable after 6 h of treatment but, unlike dexamethasone, hydrocortisone was unable to produce a sustained response after 24 h (Fig. 2C). Finally, in order to check the specificity of the PPAR $\alpha$  induction, we measured the expression of the thyroid hormone receptor  $\alpha 1$  (TR $\alpha$ 1) gene. This receptor belongs to the same subfamily as PPAR $\alpha$  and is also expressed in hepatocytes. As shown in Fig. 2A, TR $\alpha$ 1 mRNA levels are not induced by dexamethasone, but they appear to be slightly down-regulated. We therefore conclude that all the glucocorticoids tested were able to increase PPAR $\alpha$  mRNA levels in a dose-dependent manner.

**Direct Transcriptional Induction of PPAR $\alpha$  Expression by Glucocorticoids**—Next, we tested whether the glucocorticoid effect on PPAR $\alpha$  mRNA expression was at the transcriptional or post-transcriptional level by treating hepatocytes for 6 or 24 h with dexamethasone in the presence of the transcriptional inhibitor actinomycin D (Fig. 3, A and B). This treatment reduced the PPAR $\alpha$  mRNA levels and prevented induction by dexamethasone, ruling out an effect of dexamethasone on the PPAR $\alpha$  mRNA stability in which case a higher level would have



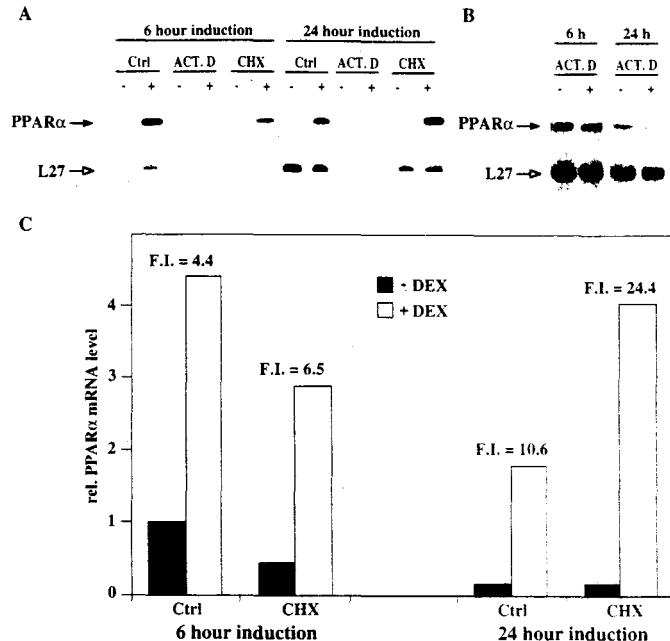
**FIG. 2.** PPAR $\alpha$  mRNA levels are induced in a dose-dependent manner by several glucocorticoids. Primary hepatocytes were treated as explained in Fig. 1 during 24 h with either dexamethasone (DEX), triamcinolone (TRIAM), or hydrocortisone (HC) at increasing concentrations. The doses are indicated as the logarithm of the hormone concentration. A, RNase protection was performed with 7  $\mu$ g of total RNA. PPAR $\alpha$  and L27 mRNAs were tested concomitantly in all samples. In addition, TR $\alpha$ 1 mRNA was separately tested in the samples corresponding to the dexamethasone-treated hepatocytes. B, dose-response curves showing L27-normalized PPAR $\alpha$  mRNA levels as a function of the hormone concentration. C, comparison of hydrocortisone and dexamethasone effects after 6 and 24 h of incubation. Hepatocytes were treated for either 6 or 24 h with either 10 $^{-6}$  M hydrocortisone (HC) or 10 $^{-6}$  M dexamethasone (DEX) or vehicle (Ctrl). RNase protection was performed with 8  $\mu$ g of total RNA.

been observed in hormone-treated cells. Furthermore, the induction of PPAR $\alpha$  mRNA by dexamethasone was not inhibited by cycloheximide (Fig. 3, A and C), showing that protein synthesis is not required for PPAR $\alpha$  mRNA induction. This suggests that pre-existing GR mediated the glucocorticoid induction of PPAR $\alpha$  mRNA.

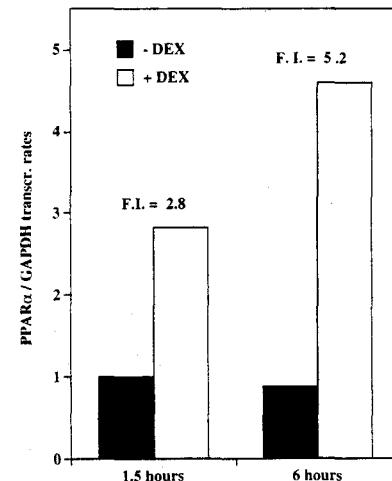
To demonstrate more directly a transcriptional control of PPAR $\alpha$  expression by glucocorticoids, a nuclear run-on analysis was performed. In nuclei isolated from hepatocytes treated for 1.5 or 6 h with dexamethasone at 10 $^{-6}$  M, PPAR $\alpha$  transcription was increased by a factor 3 and 5, respectively, when normalized to glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (Fig. 4) or to actin transcription rates (data not shown).

Together, these results identify the PPAR $\alpha$  gene as an early response gene for glucocorticoid action since regulation occurs at the transcriptional level in the absence of protein synthesis.

**Conclusions**—The results presented herein demonstrate a transcriptional control by glucocorticoid hormones of the PPAR $\alpha$  gene expression. Interaction of this regulatory pathway with the fatty acid signaling pathway would suggest the existence of an activation cascade involving the following steps: (a) activation of the GR by glucocorticoids; (b) induction of the PPAR $\alpha$  gene by the activated GR; (c) activation of the PPAR $\alpha$  by its cognate ligand; (d) induction of the expression of PPAR target genes by the activated PPAR $\alpha$ . In this model, both glucocorticoids and a PPAR $\alpha$  activator have to be present for the cascade to work. Hence, it may explain the cooperative effect observed between glucocorticoids and peroxisome proliferators on the expression of several PPAR target genes (21).<sup>4</sup> *In vivo*, such a regulatory cascade would be of great physiological significance since many PPAR target genes are involved in lipid



**FIG. 3.** Actinomycin D and cycloheximide effects on PPAR $\alpha$  inducibility by dexamethasone. Hepatocytes were treated during 6 or 24 h with 10 $^{-6}$  M dexamethasone (+) or vehicle (-). When indicated, either actinomycin D at 5  $\mu$ g/ml (ACT. D) or cycloheximide at 10  $\mu$ g/ml (CHX) was added to the culture medium simultaneously with the hormone. None of these inhibitors was added in control conditions (Ctrl). A, PPAR $\alpha$  and L27 mRNAs were tested by RNase protection with 8  $\mu$ g of total RNA. B, the lanes corresponding to the actinomycin D-treated samples of panel A are shown as detected by the Molecular Imager. C, diagram showing L27-normalized PPAR $\alpha$  mRNA levels. Since the L27 mRNA levels were affected by the actinomycin D treatment (see panel A, ACT. D), PPAR $\alpha$  values could not be normalized under these conditions and are hence not represented in the histogram. The value of the control sample without hormone (first bar) was arbitrarily set to 1. Fold inductions (F.I.) of PPAR $\alpha$  mRNA levels were calculated as the ratios of the values corresponding to hormone-treated hepatocytes over those of untreated cells. DEX, dexamethasone.



**FIG. 4.** Nuclear run-on analysis of the PPAR $\alpha$  transcription rate after dexamethasone treatment. The transcription run-on assay was performed with nuclei isolated from hepatocytes treated for 1.5 and 6 h with 10 $^{-6}$  M dexamethasone (+DEX) or vehicle (-DEX). PPAR $\alpha$  and glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase transcription rates were tested simultaneously. The histogram shows a quantification of PPAR $\alpha$  transcription rates normalized to the one of glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase. -Fold inductions (F.I.) were calculated as the ratios of induced (+DEX) over non-induced (-DEX) values.

metabolism. Glucocorticoids would therefore have a permissive and even stimulatory function in energy mobilization through lipid catabolism controlled by a PPAR activator or ligand. Since

some fatty acids are themselves PPAR activators, such a role of glucocorticoids is consistent with their lipolytic effects *in vivo*. In this context, it will be of particular interest to test if PPAR induction by glucocorticoids takes place in adipose tissue. Moreover, we might speculate that PPAR expression *in vivo* would increase in situations when glucocorticoid hormone levels are high, for example in stress conditions or during the peak of the corticosterone circadian rhythm. Currently, *in vivo* studies are under way to explore these hypotheses.

**Acknowledgments**—The excellent technical assistance of A. Tbaikhi, D. Cayet, and D. Bachmann is acknowledged. We thank Roussel Uclaf, Romainville, France, for the gift of RU 486.

#### REFERENCES

- Desvergne, B., and Wahli, W. (1994) in *Inducible Transcription* (Baeuerle, P., ed) Vol. 1, pp. 142–176. Birkhäuser Boston, Inc., Cambridge, MA
- Issemann, I., and Green, S. (1990) *Nature* **347**, 645–650
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftlenbein, G., and Wahli, W. (1992) *Cell* **68**, 879–887
- Sher, T., Yi, H. F., McBride, O. W., and Gonzalez, F. J. (1993) *Biochemistry* **32**, 5598–5604
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I., and Spiggleman, B. M. (1994) *Genes & Dev.* **8**, 1224–1234
- Schmidt, A., Endo, N., Rutledge, S. J., Vogel, R., Shinar, D., and Rodan, G. A. (1992) *Mol. Endocrinol.* **6**, 1634–1641
- Zhu, Y., Alvares, K., Huang, Q., Rao, M. S., and Reddy, J. K. (1993) *J. Biol. Chem.* **258**, 26817–26820
- Staels, B., Hum, D. W., and Miller, W. L. (1993) *Mol. Endocrinol.* **7**, 423–433
- Chen, F., Law, S. W., and O'Malley, B. W. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 671–677
- Göttlicher, M., Widmark, E., Li, Q., and Gustafsson, J.-A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4653–4657
- Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K., and Wahli, W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 2160–2164
- Bardot, O., Aldridge, T. C., Latruffe, N., and Green, S. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 37–45
- Tugwood, J. D., Issemann, I., Anderson, R. G., Bundell, K. R., McPheat, W. L., and Green, S. (1992) *EMBO J.* **11**, 433–439
- Marcus, S. L., Miyata, K. S., Zhang, B. W., Subramani, S., Rachubinski, R. A., and Capone, J. P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 5723–5727
- Muerhoff, A. S., Griffin, K. J., and Johnson, E. F. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 19051–19053
- Rodriguez, J. C., Gil-Gomez, G., Hegardt, F. G., and Haro, D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, in press
- Auwerx, J. (1992) *Horm. Res. (Basel)* **38**, 269–277
- Fain, J. N., Kovacev, V. P., and Scow, R. O. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 3522–3528
- Divertie, G. D., Jensen, M. D., and Miles, J. M. (1991) *Diabetes* **40**, 1228–1232
- Amri, E. Z., Ailhaud, G., and Grimaldi, P. (1991) *J. Lipid Res.* **32**, 1457–1463
- Sørensen, H. N., Hvattum, E., Paulsen, E. J., Gautvik, K. M., Bremer, J., and Spydevold, O. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1171**, 263–271
- Crowe, J. S., Cooper, H. J., Smith, M. A., Sims, M. J., Parker, D., and Gewert, D. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 184
- Berry, M. N., and Friend, D. S. (1969) *J. Cell Biol.* **43**, 506–520
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156–159
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, pp. 7.71–7.78, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Gorski, K., Carneiro, M., and Schibler, U. (1986) *Cell* **47**, 767–776
- Nevins, J. R. (1987) *Methods Enzymol.* **152**, 234–241
- Petty, K. J., Desvergne, B., Mitsuhashi, T., and Nikodem, V. M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7395–7400

## PUBLICATION IV

EXPRESSION OF THE PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR  $\alpha$  GENE IS STIMULATED BY STRESS AND FOLLOWS A DIURNAL RHYTHM

Régis Saladin, Thomas Lemberger, Françoise Assimacopoulos,  
Bart Staels, Walter Wahli et Johan Auwerx

J. Biol. Chem., 1996, 271, 1764-1769

# Expression of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor $\alpha$ Gene Is Stimulated by Stress and Follows a Diurnal Rhythm\*

(Received for publication, October 12, 1995)

Thomas Lemberger<sup>†§</sup>, Régis Saladin<sup>†¶</sup>, Manuel Vázquez<sup>‡</sup>, Françoise Assimacopoulos<sup>\*\*</sup>,  
Bart Staels<sup>†||</sup>, Béatrice Desvergne<sup>‡</sup>, Walter Wahli<sup>‡§§</sup>, and Johan Auwerx<sup>†|| §§</sup>

From the <sup>†</sup>Institut de Biologie Animale, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland, the <sup>¶</sup>Laboratoire de Biologie des Régulations chez les Eucaryotes, U.325 INSERM, Département d'Athérosclérose, Institut Pasteur, 59019 Lille, France, the <sup>\*\*</sup>Département de Biochimie Médicale, Centre Médical Universitaire, CH-1211 Geneva, Switzerland

**Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)** are nuclear hormone receptors that can be activated by fatty acids and peroxisome proliferators. The PPAR $\alpha$  subtype mediates the pleiotropic effects of these activators in liver and regulates several target genes involved in fatty acid catabolism. In primary hepatocytes cultured *in vitro*, the PPAR $\alpha$  gene is regulated at the transcriptional level by glucocorticoids. We investigated if this hormonal regulation also occurs in the whole animal in physiological situations leading to increased plasma corticosterone levels in rats. We show here that an immobilization stress is a potent and rapid stimulator of PPAR $\alpha$  expression in liver but not in hippocampus. The injection of the synthetic glucocorticoid dexamethasone into adult rats produces a similar increase in PPAR $\alpha$  expression in liver, whereas the administration of the antiglucocorticoid RU 486 inhibits the stress-dependent stimulation. We conclude that glucocorticoids are major mediators of the stress response. Consistent with this hormonal regulation, hepatic PPAR $\alpha$  mRNA and protein levels follow a diurnal rhythm, which parallels that of circulating corticosterone. To test the effects of variations in PPAR $\alpha$  expression on PPAR $\alpha$  target gene activity, high glucocorticoid-dependent PPAR $\alpha$  expression was mimicked in cultured primary hepatocytes. Under these conditions, hormonal stimulation of receptor expression synergizes with receptor activation by WY-14,643 to induce the expression of the PPAR $\alpha$  target gene acyl-CoA oxidase. Together, these results show that regulation of the PPAR $\alpha$  expression levels efficiently modulates PPAR activator signaling and thus may affect downstream metabolic pathways involved in lipid homeostasis.

The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)<sup>1</sup>

\* This work was supported by the Etat de Vaud, the Swiss National Science Foundation, CNRS, INSERM, and by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† These authors have contributed equally to this work.

¶ Recipient of an European Science Foundation grant.

|| Chargé de Recherche.

§ Correspondence should be addressed either to W. Wahli: Institut de Biologie Animale, Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland. Tel.: 41-21-692-4110; Fax: 41-21-692-4105; E-mail: walter.wahli@iba.unil.ch or to J. Auwerx, LBRE U325 INSERM, Institut Pasteur, 1 Rue Calmette, 59019 Lille Cédex, France. Tel.: 33-20-877752; Fax: 33-20-877360.

|| Directeur de Recherche of the CNRS.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; ACO, acyl-CoA oxidase; BW, body weight.

are orphan nuclear hormone receptors (1, 2). To date, three different subtypes, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  or - $\delta$  (also named FAAR or NUC1), and PPAR $\gamma$ , have been cloned in amphibians (3), rodents (4–10), and man (11–13). Within the nuclear hormone receptor superfamily, PPARs belong to the subfamily that comprises the thyroid hormone receptors and retinoic acid receptors (14). The first PPAR cDNA cloned was isolated from a mouse liver library and corresponds to the PPAR $\alpha$  subtype (4). This receptor was shown to be activated by peroxisome proliferators (3, 4), a class of compounds that have characteristic pleiotropic effects, especially in rodents. In hepatocytes, peroxisome proliferators cause a dramatic increase in the number and the size of peroxisomes, an effect associated with a concomitant induction of the activity of several enzymes of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway (15). Definitive proof that PPAR $\alpha$  is the major mediator of these effects was provided by the absence of the typical hepatic response to peroxisome proliferators in PPAR $\alpha$ -deficient mice generated by targeted disruption of the PPAR $\alpha$  gene (16). Whereas little is known about the mechanisms that lead to peroxisome proliferation, the associated increase in the level of expression of several genes is better understood. Indeed, several PPAR $\alpha$  target genes were identified that contain one or several PPAR-responsive elements in their promoter (1, 2). To date, the known PPAR $\alpha$  target genes code for enzymes involved in the following metabolic pathways: (i) activation of fatty acids to acyl coenzyme A (CoA) derivatives (acyl-CoA synthetase, Ref. 17), (ii) peroxisomal  $\beta$ -oxidation (acyl-CoA oxidase (ACO), Refs. 3, 18, and 19, and bifunctional enzyme, Ref. 20), (iii) mitochondrial  $\beta$ -oxidation (medium chain acyl-CoA dehydrogenase, Ref. 21), (iv) microsomal  $\omega$ -oxidation (CYP 4A6, Ref. 22) and (v) ketogenesis (hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, 23). In addition, the genes coding for apolipoproteins AI (24), AII (25), and CIII (26) are also regulated by PPAR $\alpha$ , suggesting an involvement of these receptors in the regulation of the extracellular transport of lipids.

Although peroxisome proliferators are now used as prototypical activators of PPAR $\alpha$ , there is still no evidence that these compounds bind directly to the receptor. The only PPAR ligands identified so far are antidiabetic agents of the thiazolidinedione family, which bind with high affinity to PPAR $\gamma$  (27). The discovery that several fatty acids, such as arachidonic acid or linoleic acid, activate PPAR $\alpha$  suggests that fatty acids could represent biological activators (5, 18). According to this hypothesis, PPAR $\alpha$  could function as a fatty acid sensor, which would allow the fatty acids to regulate their own metabolism (1, 2).

PPAR $\alpha$  mRNA is predominantly expressed in tissues capable of oxidizing fatty acids, such as brown adipose tissue, liver, heart, kidney, and muscle (8). Absence of PPAR $\alpha$  expression in knockout mice prevents the inducibility of several target genes

in liver, including ACO and bifunctional enzyme, by peroxisome proliferators, suggesting that the level of expression of PPAR $\alpha$  is important for the proper regulation of these genes *in vivo* (16). In fact, PPAR $\alpha$  expression in adult rat liver is subject to marked interindividual variations for so far unknown reasons.<sup>2</sup> We and others (28, 29) have shown recently that PPAR $\alpha$  expression is directly regulated at the transcriptional level by glucocorticoids in rat hepatocytes or hepatoma cell lines cultured *in vitro*. This regulation is mediated by the glucocorticoid receptor and does not involve stabilization of the mRNA (28). These findings suggested that PPAR $\alpha$  expression in liver could be subject to hormonal regulation *in vivo* in situations of high circulating glucocorticoid levels.

In the present study, we show that PPAR $\alpha$  mRNA levels increase in rat liver during an immobilization stress situation and follow a diurnal rhythm. The impact of variations in the levels of PPAR $\alpha$  expression on the regulation of a prototypical PPAR $\alpha$  target gene, the ACO gene, is furthermore analyzed using hepatocytes in primary culture.

#### MATERIALS AND METHODS

**Animals and Treatment**—Eight-week-old male Fisher 344 rats (BRL, Basel, Switzerland) were group-housed and had free access to water and food. The animals were kept on a 12-h light-dark cycle (light from 8:00 a.m. to 8:00 p.m. in the stress and dexamethasone experiments; light from 7:30 a.m. to 7:30 p.m. in the diurnal variation experiment). All animals were accustomed to this cycle during at least 14 days. Rats were stressed by immobilization in transparent plastic tubes (5 cm diameter, 20 cm long) with small holes in the front allowing breathing and a hole at the back for the tail. Immobilization started at 9:00 a.m. The unstressed control animals were not manipulated during the duration of the experiment. Stressed ( $n = 3$ ) and control ( $n = 3$ ) rats were sacrificed at the same time. In the RU 486 experiments, both the stressed ( $n = 3$ ) and control ( $n = 3$ ) animals were injected subcutaneously with either vehicle or 30 mg/kg body weight (BW) of RU 486 dissolved in 200  $\mu$ l of propylene glycol. In the dexamethasone treatment experiments, animals were injected intraperitoneally, under mild Forene (Abbott, Cham, Switzerland) anesthesia, with either vehicle ( $n = 3$ ) or 40  $\mu$ g/kg BW of dexamethasone dissolved in 500  $\mu$ l of saline containing 1% ethanol ( $n = 3$ ). In the diurnal variation experiment, the rats (12 animals) were sacrificed at precise time points (9:00 a.m., 3:30 p.m., 5:00 p.m., and 6:30 p.m.). For each time point, the animals ( $n = 3$ ) were sacrificed on three consecutive days. Since, in this experiment, the rats were housed in groups of five animals in four independent cages, the last animals killed were never alone, thus preventing an isolation stress. Furthermore, the rats were picked randomly among the four cages. The rats used in the dexamethasone and diurnal expression experiments were sacrificed by decapitation under Forene anesthesia, whereas the rats in the stress experiments were sacrificed by exsanguination under ether anesthesia. Blood samples were collected in heparinized tubes (Milan, Geneva) and centrifuged. Plasma was frozen until analyzed. The tissues were rapidly dissected and frozen in liquid nitrogen.

**Corticosterone Measurements**—Plasma corticosterone levels were measured by radioimmunoassay (30).

**RNA Preparation and Analysis**—Total RNA was prepared using either the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method (31) or using the TRIzol Reagent (Life Technologies, Inc.). Quantification of PPAR $\alpha$  and L27 mRNA levels by RNase protection assay were performed as described (28). ACO mRNA was detected by RNase protection using a rat ACO probe corresponding to the 447 nucleotide long *SacI-SacI* fragment of the full-length cDNA (32).

**Antibodies**—A polyclonal antibody raised against the AB domain of mPPAR $\alpha$  was generated as follows. A cDNA fragment corresponding to the 101 first amino acids of mPPAR $\alpha$  was amplified by PCR from the full-length cDNA (Ref. 4, upstream primer: 5'-CCGGATCCATGGTG-GACACAGAGAGCC-3', downstream primer: 5'-GCGCCCGGGATGT-TCAGGGCACTGCCGG-3') and digested with *Bam*H I and *Sma*I. This fragment was cloned into the bacterial expression pQE-9 vector (Qiagen) using the *Bam*H I and Klenow-filled *Hind*III sites. The same fragment was inserted into the pGEX-2T vector (Pharmacia Biotech Inc.) using the *Bam*H I and *Sma*I sites. The pQE-9 construct was used to

overexpress the mPPAR $\alpha$ /AB domain fused to a 6  $\times$  His tag in XL-1 bacteria (Stratagene). The resulting soluble polypeptide was purified from bacterial extract by affinity chromatography on a nickel-nitrilotriacetic acid-agarose column under native conditions according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). The purified polypeptide was injected subcutaneously into KOBU rabbits (one primary and four booster injections of 200  $\mu$ g). Serum was collected 10 days after the final antigen injection. To affinity purify the serum, an antigen-coupled column was prepared. The pGEX-2T construct described above was used to overexpress a GST-PPAR $\alpha$ /AB domain fusion protein, which was purified onto a glutathione-Sepharose column (Pharmacia) and coupled to a *N*-hydroxysuccinylimide-activated Hi-Trap column (Pharmacia). The resulting affinity column was then used to purify the immune serum. The resulting polyclonal antibody cross-reacts with rat PPAR $\alpha$ , which is 98% conserved at the amino acid level in the AB region. Preimmune serum IgGs were purified using a protein G-Sepharose 4 fast flow column (Pharmacia).

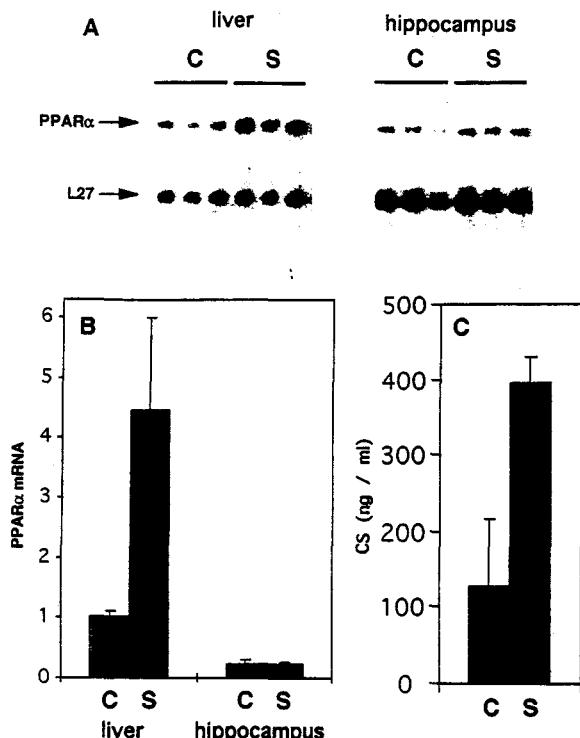
**Nuclear Extracts and Western Blotting**—Nuclei were prepared as follows. Liver samples (0.5 g) or cultured hepatocytes ( $2.4 \times 10^7$  cells) were homogenized in 0.5 M sucrose, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 25 mM KCl (0.5 M sucrose TEKS). Cells were lysed with 0.5% Triton X-100 for 30 min at 4 °C. The homogenate was then layered on a 0.9 M sucrose TEKS cushion and centrifuged at 2000  $\times$  g for 20 min. Nuclei were resuspended in 40% glycerol, 50 mM Tris-Cl, pH 8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA and stored at -70 °C. The concentrations of the nuclei were determined by measuring A at 260 nm in 5 M NaCl. Nuclei were lysed directly in SDS-gel loading buffer and loaded onto a 10% polyacrylamide-SDS gel. After electrotransfer on nitrocellulose, equal loading was checked by staining the blots with 0.2% Ponceau S red. The blots were blocked 1 h at 25 °C with 5% non-fat dry milk in 25 mM Tris-Cl, pH 8.3, 140 mM NaCl, 2 mM KCl, and 0.05% Tween 20 (NFDM TBS-Tween) and incubated overnight at 4 °C with the primary antibody at a dilution of 1:1000 in 5% NFDM TBS-Tween. Six 10-min washes at 25 °C with 5% NFDM TBS-Tween were performed. The filters were subsequently incubated 2 h at 25 °C with the secondary antibody, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Cappel, Turnhout, Belgium), at a dilution of 1:1000 in 5% NFDM TBS-Tween and washed six times 10 min in TBS-Tween. Signal detection was achieved by chemiluminescence with the ECL system (Amersham) and 15-s to 5-min exposure to x-ray films. Signals were quantified using an Elscript 400-AT/SM densitometer (ATH, Neuried, Switzerland).

**Hepatocytes Primary Cultures**—Rat hepatocytes were isolated by collagenase perfusion (33) of livers from 200–250 g rats (cell viability higher than 85% by trypan blue exclusion test). The hepatocytes were cultured in monolayer ( $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) in Williams' E medium (Life Technologies, Inc.) supplemented with 5% fetal calf serum and antibiotics, at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. Treatments with WY-14,643 (100  $\mu$ M in ethanol) and dexamethasone (1  $\mu$ M in ethanol) were started immediately after seeding.

#### RESULTS

**Stress Induces PPAR $\alpha$  mRNA Expression**—Physical and psychological stress triggers a multihormonal response that mainly comprises the release of catecholamines by the sympathetic nervous system and glucocorticoids by the adrenal cortex (34, 35). The glucocorticoid levels in blood are elevated during experimental stress situations such as swimming, heat or cold exposure, photic or acoustic stimuli, and forced immobilization (36–38). Since the PPAR $\alpha$  gene is under direct control of glucocorticoid hormones in rat hepatocytes cultured *in vitro* (28, 29), we used stress as an *in vivo* paradigm to study the regulatory effects of circulating glucocorticoids on the expression of the PPAR $\alpha$  gene. In this study, an immobilization protocol was used because it is not associated with an increase of physical activity, in contrast to swimming for example. The reason to avoid experimental protocols requiring physical activity was that PPARs are involved in energy homeostasis (1). PPAR $\alpha$  expression was analyzed in rats stressed by forced immobilization during 4 h. All stress experiments were started at 9 a.m. to circumvent interference with the diurnal variations of plasma corticosterone levels (see below). For the same reason, unstressed control animals were sacrificed at the same time as the stressed animals. The 4-h immobilization led to a 3-fold increase in the plasma levels of corticosterone, which is the

<sup>2</sup> T. Lemberger, W. Wahli, and J. Auwerx, unpublished results.

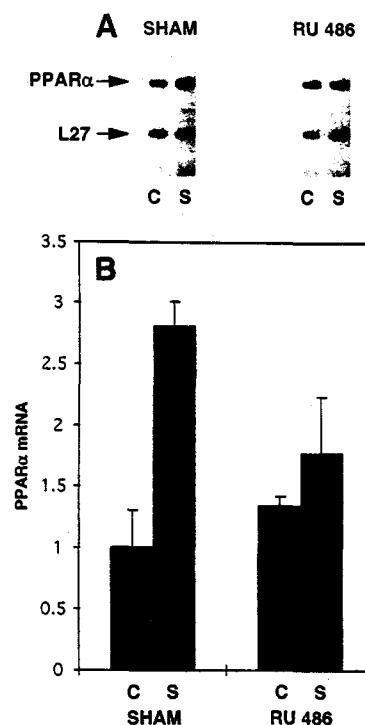


**FIG. 1. Stress stimulates PPAR $\alpha$  expression in liver.** A 4-h immobilization stress was achieved as described under "Materials and Methods." Total RNA (15  $\mu$ g) was analyzed by RNase protection assay using a probe for the PPAR $\alpha$  mRNA and a probe for the mRNA of the large ribosomal subunit 27-kDa protein (L27) as control. *A*, in the liver (*left panel*), the stressed animals (*S*,  $n = 3$ ) show higher levels of PPAR $\alpha$  mRNA than the unstressed control animals (*C*,  $n = 3$ ). In contrast, there is no variation in PPAR $\alpha$  mRNA levels in the hippocampus of the same animals (*right panel*). *B*, graphic representation of PPAR $\alpha$  mRNA levels in liver and hippocampus of the control (*C*) and stressed (*S*) animals. PPAR $\alpha$  mRNA levels were normalized to those of L27. The PPAR $\alpha$  mRNA level in liver was arbitrarily set to 1. *C*, plasma corticosterone (CS) levels (ng/ml) of stressed (*S*) and control animals (*C*). Results are the mean  $\pm$  S.D. of three animals.

major active glucocorticoid in rats (Fig. 1*C*). Total RNA was extracted from liver and hippocampus, a structure in the central nervous system that contains significant amounts of PPAR $\alpha$  (39) and that has been described as one of the regions of the brain most sensitive to stress and glucocorticoids (40). Rat PPAR $\alpha$  mRNA levels, as well as the levels of the mRNA of the large ribosomal subunit 27-kDa protein (L27) as a control, were assayed by RNase protection. After a 4-h immobilization, stressed animals displayed a 4.5-fold increase in the PPAR $\alpha$  mRNA levels in liver relative to the unstressed animals (Fig. 1, *A* and *B*). Stress is therefore a potent physiological inducer of PPAR $\alpha$  expression in liver. In contrast to the liver, no significant variation of PPAR $\alpha$  mRNA levels could be detected in the hippocampus (Fig. 1, *A* and *B*).

To test whether glucocorticoids are indeed involved in the stress-dependent stimulation of PPAR $\alpha$  expression, animals were treated before immobilization with the specific glucocorticoid antagonist RU 486 (30 mg/kg BW), or saline as control, and the effect on PPAR $\alpha$  mRNA levels was analyzed. In the saline-injected animals, the 4-h immobilization produced a significant 3-fold increase of PPAR $\alpha$  mRNA levels in liver (Fig. 2). In marked contrast, the stress-dependent induction of PPAR $\alpha$  expression was inhibited in the rats injected with RU 486 (Fig. 2). These results demonstrate that glucocorticoids are the major endocrine mediators of the induction of PPAR $\alpha$  expression by stress.

If glucocorticoids are indeed directly involved in the stimu-



**FIG. 2. RU 486 inhibits the stress-dependent stimulation of PPAR $\alpha$  expression.** Rats were injected subcutaneously either with vehicle (*SHAM*) or with 30 mg/kg BW RU 486. Immediately after the injection, the control animals (*C*) were returned to their cage, whereas the stressed animals were subjected to a 4-h immobilization. Liver total RNA was analyzed as described in Fig. 1. *A*, representative results obtained after vehicle (*SHAM*) or RU 486 injection in control (*C*) and stressed (*S*) animals are shown. *B*, quantification of L27-normalized PPAR $\alpha$  levels in liver of vehicle (*SHAM*) or RU 486 injected stressed (*S*) and control (*C*) animals. Results depict the mean  $\pm$  S.D. of three animals.

lation of PPAR $\alpha$  mRNA expression induced by stress, the acute injection of exogenous glucocorticoids should lead to increased PPAR $\alpha$  mRNA levels. Rats were hence injected either with saline or with dexamethasone (40  $\mu$ g/kg BW) and sacrificed 4 h later. As predicted, dexamethasone-injected rats displayed 3.5-fold higher PPAR $\alpha$  mRNA levels in liver as compared with saline-injected animals (Fig. 3, *A* and *B*). Thus, a single injection of the glucocorticoid agonist dexamethasone reproduced the effects of endogenous glucocorticoids secreted in response to stress. Another effect of administration of dexamethasone was the well described blockade of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis (37), resulting in a dramatic decrease of the levels of circulating corticosterone (Fig. 3*C*).

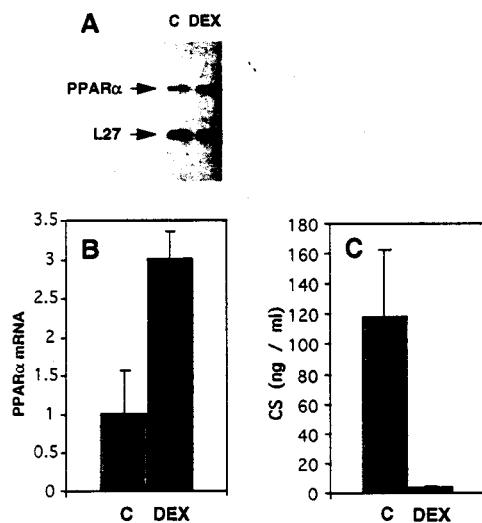
**Cycling of PPAR $\alpha$  Expression**—In rats, similar to the situation in other mammals, the circulating levels of glucocorticoids are subject to diurnal variations. The plasma levels of corticosterone, which are low in the morning, increase in the afternoon to reach a maximum about 2–3 h before the light-dark switch (41). In view of the results presented above, we expected the levels of PPAR $\alpha$  mRNA to follow a similar diurnal rhythm. Thus, we compared PPAR $\alpha$  mRNA expression in liver in the morning to its expression in the afternoon. The animals were kept on a 12-h light-dark cycle, with the light-dark switch at 7:30 p.m. Under these conditions, the peak of circulating corticosterone is expected to occur approximately at 5:00 p.m., which was indeed observed (Fig. 4*A*). Hence, liver samples were taken from animals sacrificed in the morning (9:30 a.m.) and at three different time points in the afternoon (3:30 p.m., 5:00 p.m., and 6:30 p.m.). The analysis was performed over three consecutive days to assess the periodic nature of the variations of PPAR $\alpha$  expression and to exclude the possibility of an iso-

lated stress having affected the animals. The mean values for PPAR $\alpha$  mRNA levels determined for each of the time point are higher in the afternoon than at 9:30 a.m. (3.5-fold at 3:30 p.m.; 4-fold at 5:00 p.m.; 3-fold at 6:30 p.m., Fig. 4B). These variations of PPAR $\alpha$  mRNA levels correlate well with the diurnal variations of plasma corticosterone levels (Fig. 4A), which

strongly suggests that the PPAR $\alpha$  gene responds to the diurnal variations of circulating corticosterone.

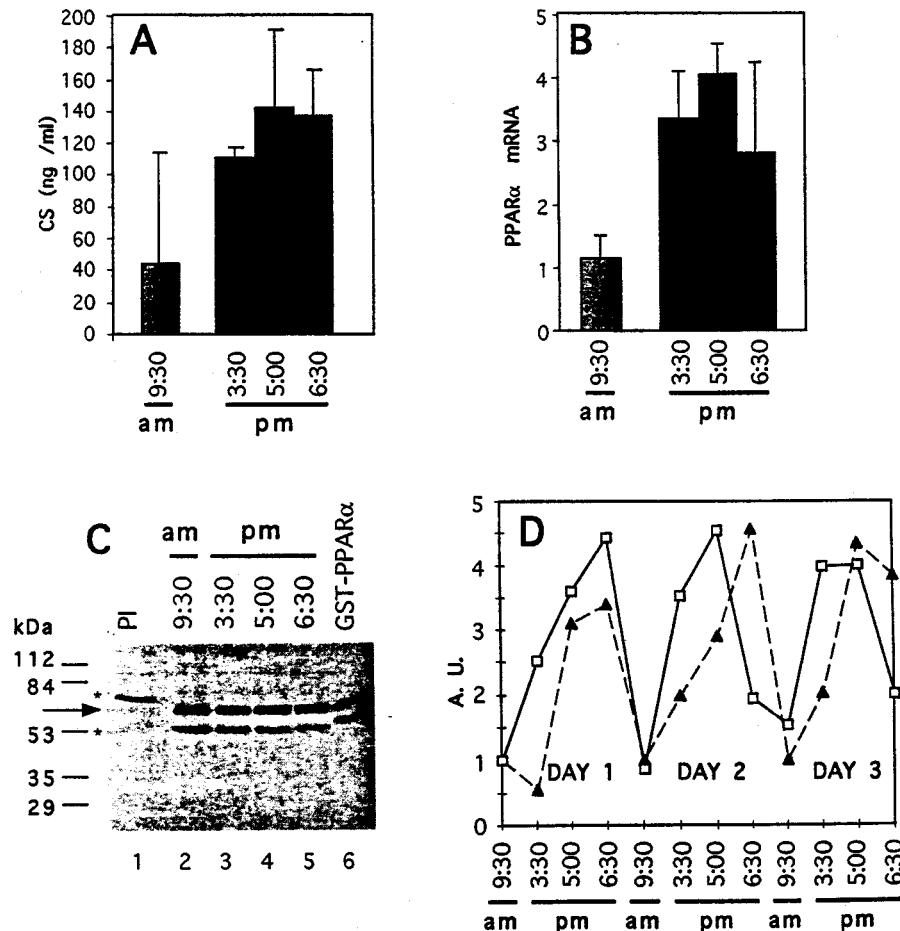
To test whether the diurnal variations of PPAR $\alpha$  mRNA levels resulted into changes in PPAR $\alpha$  protein expression, the relative levels of the receptor were measured in liver nuclear extracts. PPAR $\alpha$  protein was detected on Western blots using an anti-PPAR $\alpha$  antibody. This antibody detects a major band at 55 kDa, which corresponds to the predicted size of PPAR $\alpha$ . This signal is specific, since it is not detected by preimmune IgGs (Fig. 4C, lane 1). Moreover, its intensity is markedly reduced when the antibody is co-incubated with 20  $\mu$ g of the purified antigen (Fig. 4C, lane 6). In nuclear extracts from the liver of the animals analyzed during the second day of the 3-day experiment, PPAR $\alpha$  protein levels were low in the morning and 2-, 3-, and 5-fold higher at 3:30 p.m., 5:00 p.m., and 6:30 p.m., respectively (Fig. 4C, lanes 2–5). Similar results were obtained for the two other days of the experiment. Thus, when the levels of PPAR $\alpha$  mRNA and protein measured in each individual animal are plotted successively, according to the time at which the animal was sacrificed, both mRNA and protein levels show a striking cyclic pattern of expression over the three consecutive days (Fig. 4D).

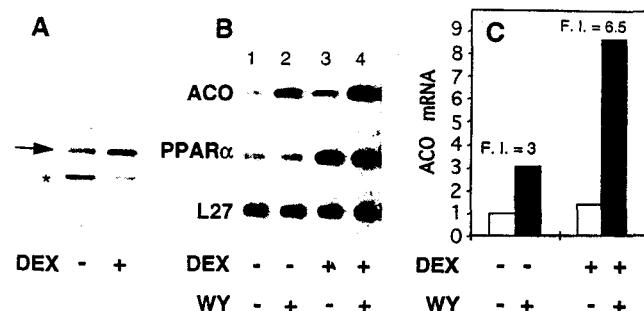
**Dexamethasone Potentiates the Induction of the ACO Gene by WY-14,643**—Animal treatments by peroxisome proliferators, such as WY-14,643, produce multiple effects. Since specific PPAR antagonists have not yet been identified, it is difficult to distinguish between the PPAR-mediated direct effects of these hypolipidemic drugs and indirect effects involving metabolic or hormonal feedback mechanisms. Thus, we used hepatocytes in primary culture as an *in vitro* model to test whether the amount of PPAR $\alpha$  protein is a limiting factor for the induction of its target genes. Dexamethasone provokes a 4-fold increase



**FIG. 3. Dexamethasone induces PPAR $\alpha$  expression in liver.** Rats were injected intraperitoneally either with vehicle (C) or 40  $\mu$ g/kg BW dexamethasone (DEX). The animals were sacrificed 4 h later. A, representative results obtained after vehicle (C) or dexamethasone (DEX) injection. B, quantification of L27-normalized PPAR $\alpha$  levels in liver of vehicle (C) or dexamethasone (DEX) injected animals ( $n = 3$ ). C, plasma corticosterone levels (ng/ml) 4 h after vehicle (C) or dexamethasone (DEX) injection. The mean  $\pm$  S.D. of three animals are shown.

**FIG. 4. Diurnal variations of PPAR $\alpha$  mRNA and protein levels in liver.** Animals were sacrificed at one time point in the morning (9:30 a.m.,  $n = 3$ ) and three time points in the afternoon (3:30 p.m., 5:00 p.m., and 6:30 p.m.,  $n = 3$  each). For each time point, the three animals were sacrificed during three consecutive days. A, plasma corticosterone levels (ng/ml) at each time point ( $n = 3$ ). B, L27-normalized PPAR $\alpha$  mRNA levels at each time point ( $n = 3$ ), determined as described in the legend to Fig. 1. C, PPAR $\alpha$  protein levels in liver nuclear extracts as analyzed by Western blotting. The affinity-purified anti-PPAR $\alpha$  antibody detects a protein of about 55 kDa corresponding to the PPAR $\alpha$  protein (arrow). This signal is not detected when preimmune IgGs are used (PI, lane 1, same extract as in lane 4) and is markedly reduced when the antibody is co-incubated with 20  $\mu$ g of the purified GST-PPAR $\alpha$ /AB fusion protein (lane 6, same extract as in lane 4). Lanes 2–5 correspond to liver nuclear extracts from the animals sacrificed on day 2 (see D) at 9:30 a.m., 3:30 p.m., 5:00 p.m., and 6:30 p.m., respectively. Unspecific bands are indicated with asterisks. D, the L27-normalized PPAR $\alpha$  mRNA levels (solid line, □) and protein levels (dashed line, ▲) are plotted successively in the sequence the animals were killed during the 3 days of the experiment. PPAR $\alpha$  mRNA and protein levels at 9:30 a.m. were set to 1 arbitrary unit (A.U.). Results in A and B represent the mean  $\pm$  S.D. of three animals.





**FIG. 5. Dexamethasone potentiates the induction of ACO gene expression by WY-14,643.** *A*, rat hepatocytes in primary culture were treated during 6 h in presence or absence of 1  $\mu$ M dexamethasone (DEX). Nuclear extracts were analyzed by Western blotting as described in the legend to Fig. 4C. The position of PPAR $\alpha$  protein is indicated (arrow). An unspecific band is indicated (asterisk). *B*, hepatocytes in primary culture were treated during 24 h with 1  $\mu$ M dexamethasone (lanes 3 and 4) and 100  $\mu$ M WY-14,643 (lanes 2 and 4). ACO, PPAR $\alpha$ , and L27 mRNA were detected by RNase protection as described in the legend to Fig. 1. *C*, L27-normalized ACO mRNA levels. The ACO mRNA level of the vehicle-treated hepatocytes was arbitrarily set to 1. *F.I.* =  $\times$ -fold induction.

of PPAR $\alpha$  protein level after 6 h of treatment (Fig. 5A). A similar result was obtained after 24 h of treatment (data not shown). It was thus possible to test if an increase of the amount of PPAR $\alpha$  protein could potentiate the stimulation of the ACO gene expression by WY-14,643, a well characterized peroxisome proliferator and activator of PPAR $\alpha$  (8). The ACO gene, which encodes the rate-limiting enzyme of peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation, is controlled by PPAR $\alpha$  through a specific response element (3). Hepatocytes cultured in the presence or absence of dexamethasone (1  $\mu$ M) were treated during 24 h with WY-14,643 (100  $\mu$ M) or vehicle. As expected, addition of dexamethasone efficiently stimulated the expression of PPAR $\alpha$  mRNA (6-fold, Fig. 5B, lanes 3 and 4). However, dexamethasone alone had no effect on ACO gene expression, presumably because of a lack of PPAR activators (Fig. 5B, lane 3, and C). In contrast, when hepatocytes were treated with WY-14,643 alone, a 3-fold increase of ACO mRNA levels was observed (Fig. 5B, lane 2, and C). Furthermore, simultaneous treatment of the hepatocytes with both WY-14,643 and dexamethasone increased the ACO mRNA levels 6.5-fold (Fig. 5B, lane 4, and C). Thus, dexamethasone provokes a marked potentiation of the induction of ACO gene by WY-14,643. These results strongly suggest that the amount of receptor is a limiting factor for the stimulation of PPAR $\alpha$  target genes.

#### DISCUSSION

The hormonal response to stress involves essentially the release of catecholamines by the sympathetic nervous system and the secretion of glucocorticoids by the adrenal medulla through the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis (35). The onset and the duration of the glucocorticoid component of the stress response are slower and more sustained, respectively, than those of the catecholamine component. Thus, elevated glucocorticoid levels can be considered as a second hormonal wave following the initial peak of catecholamines. Our results demonstrate that, *in vivo*, the PPAR $\alpha$  gene responds mainly to the glucocorticoid component of the hormonal response to stress. Indeed, using the antagonist RU 486 and the agonist dexamethasone, it was shown that glucocorticoids are necessary and sufficient to induce PPAR $\alpha$  gene expression in liver during stress situations. Interestingly, stress was unable to modify PPAR $\alpha$  expression in the hippocampus, despite the presence of glucocorticoid receptor in this tissue. One hypothesis is that liver-specific factors are required to permit the regulatory action of glucocorticoid re-

ceptor on the PPAR $\alpha$  gene promoter. Alternatively, brain-specific factors might inhibit this regulation. In liver, the induction of PPAR $\alpha$  mRNA is a fast response since it can be observed already 4 h after immobilization or agonist injection. The rapid regulation of PPAR $\alpha$  mRNA expression *in vivo* reported herein argues for a similar direct transcriptional effect of glucocorticoids on PPAR $\alpha$  gene expression in liver as in hepatocytes cultured *in vitro* (28, 29).

The metabolic response to stress is characterized by energy mobilization. Under the action of lipolytic hormones (catecholamines mainly), fatty acid mobilization occurs in the adipose tissue. In liver, the mobilized fatty acids enter the  $\beta$ -oxidation pathway and ketogenesis is stimulated (42). Remarkably, PPAR $\alpha$  regulates genes involved in the activation of fatty acids as well as in the  $\beta$ -oxidation and ketogenesis pathways (1). Thus, stimulation of PPAR $\alpha$  expression in liver by glucocorticoids during stress may potentiate the regulation of these target genes and contribute to the stimulation of the metabolic pathways involved in energy homeostasis.

The expression of the PPAR $\alpha$  gene is showing a diurnal cycling pattern in liver, which parallels that of circulating corticosterone. This is consistent with a high sensitivity in liver of the PPAR $\alpha$  gene to the levels of circulating corticosterone. The diurnal variations of PPAR $\alpha$  mRNA is closely followed by a parallel cycling of PPAR $\alpha$  protein suggesting that PPAR $\alpha$  mRNA is efficiently translated. Furthermore, the cycling of the PPAR $\alpha$  protein levels implies that the half-life of the protein is short enough to allow its levels to significantly decrease after 12 h. Altogether, these results suggest that PPAR $\alpha$  signaling pathway may be efficiently modulated by a rapid and transient regulation of receptor levels. Post-translational mechanisms may furthermore exist, since we did not detect clear variations of PPAR $\alpha$  protein levels after a 4-h stress (data not shown). Alternatively, this very short time of stimulation may be insufficient to give rise to a detectable increase of PPAR $\alpha$  protein levels.

The investigation of the glucocorticoid-dependent regulation of PPAR $\alpha$  gene was possible in the whole animal, since physiological situations associated with variations of circulating glucocorticoids are well characterized. Moreover, specific glucocorticoid agonists and antagonists are available. More difficult is the *in vivo* study of PPAR $\alpha$ -mediated gene regulation, since the natural ligands of this receptor are still unknown, and specific agonists or antagonists have not been reported so far. The PPAR activators known to date, such as peroxisome proliferators, have pleiotropic effects *in vivo*, making it difficult to discriminate between the direct and indirect actions of these drugs in the animal. In contrast, hepatocyte primary cultures represent a model close to the *in vivo* situation, which is, however, isolated from the hormonal and metabolic complexity of the intact animal. Using this system, we show that high levels of expression of PPAR $\alpha$  and activation of the receptor are necessary for a maximal stimulation of PPAR $\alpha$  target genes. Indeed, the dexamethasone-dependent increase in PPAR $\alpha$  expression is associated with a marked potentiation of the effects of the PPAR $\alpha$  activator WY-14,643 on the expression of the ACO gene. These experiments provide evidence that the amount of receptor is a limiting factor and thus that the regulation of the level of PPAR $\alpha$  expression by glucocorticoids has impact on the regulation of its target genes. In the whole animal, the exact physiological conditions in which such a glucocorticoid-dependent modulation of PPAR $\alpha$  signaling occurs remain, however, to be investigated. For example, we did not observe diurnal variations in expression of the ACO gene (data not shown). This may well be due to the absence of significant levels of endogenous PPAR $\alpha$  ligand. The same phe-

nomenon was observed in primary hepatocytes in which the induction of PPAR $\alpha$  expression by dexamethasone is insufficient to stimulate ACO mRNA levels in the absence of an activator of the receptor. These observations suggest that activation of the receptor is a prerequisite for an effect of glucocorticoids on PPAR $\alpha$  target genes. Investigation of physiological states in which these conditions are fulfilled, that is in which PPAR activators/ligand are produced, will possibly give important clues for the identification of the natural PPAR $\alpha$  ligand.

In conclusion, data in this paper suggest that glucocorticoids have an important regulatory impact on PPAR $\alpha$  expression *in vivo*. Physiological situations, such as stress and the diurnal surge of glucocorticoids, affect PPAR $\alpha$  expression in liver. The regulation of PPAR $\alpha$  expression provides a control mechanism which, when coupled to activator availability, regulates the PPAR $\alpha$  action on its target genes and associated metabolic pathways.

**Acknowledgments**—We thank Roussel Uclaf, Romainville, France, for the gift of RU 486.

#### REFERENCES

- Wahli, W., Braissant, O., and Desvergne, B. (1995) *Chem. & Biol.* **2**, 261–266
- Desvergne, B., and Wahli, W. (1995) in *Inducible Transcription* (Baeuerle, P., ed) Vol. 1, pp. 142–176, Birkhäuser, Boston
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helfttenbein, G., and Wahli, W. (1992) *Cell* **68**, 879–887
- Issemann, I., and Green, S. (1990) *Nature* **347**, 645–650
- Göttlicher, M., Widmark, E., Li, Q., and Gustafsson, J. Å. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4653–4657
- Amri, E.-Z., Bonino, F., Ailhaud, G., Abumrad, N. A., and Grimaldi, P. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 2367–2371
- Chen, F., Law, S. W., and O'Malley, B. W. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 671–677
- Klever, S. A., Forman, B. M., Blumberg, B., Ong, E. S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D. J., Umesono, K., and Evans, R. M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7355–7359
- Zhu, Y., Alvares, K., Huang, Q., Rao, S. M., and Reddy, J. K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 26817–26820
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I., and Spiegelman, B. M. (1994) *Genes & Dev.* **8**, 1224–1234
- Sher, T., Yi, H. F., McBride, O. W., and Gonzalez, F. J. (1993) *Biochemistry* **32**, 5598–5604
- Greene, M. E., Blumberg, B., McBride, B., Yi, H. F., Kronquist, K., Kwan, K., Hsieh, L., Greene, G., and Nimer, S. D. (1995) *Gene Expression* **4**, 281–299
- Schmidt, A., Endo, N., Rutledge, S. J., Vogel, R., Shinar, D., and Rodan, G. A. (1992) *Mol. Endocrinol.* **6**, 1634–1641
- Dreyer, C., Keller, H., Mahfoudi, A., Lauden, V., Krey, G., and Wahli, W. (1993) *Biol. Cell* **77**, 67–76
- Lock, E. A., Mitchell, A. M., and Elcombe, C. R. (1989) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **29**, 145–163
- Lee, S. S. T., Pineau, T., Drago, J., Lee, E. J., Owens, J. W., Kroetz, D. L., Fernandez-Salguero, P. M., Westphal, H., and Gonzalez, F. J. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3012–3022
- Schoonjans, K., Watanabe, M., Suzuki, H., Mahfoudi, A., Krey, G., Wahli, W., Grimaldi, P., Staels, B., Yamamoto, T., and Auwerx, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 19269–19276
- Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K., and Wahli, W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 2160–2164
- Tugwood, J. D., Issemann, I., Anderson, R. G., Bundell, K. R., McPheat, W. L., and Green, S. (1992) *EMBO J.* **11**, 433–439
- Zhang, B., Marcus, S. L., Sajadi, F. G., Alvares, K., Reddy, J. K., Subramani, S., Rachubinski, R. A., and Capone, J. P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7541–7545
- Gulick, T., Cresci, S., Caira, T., Moore, D. D., and Kelly, D. P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 11012–11016
- Muerhoff, A. S., Griffin, K. J., and Johnson, E. F. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 19051–19053
- Rodriguez, J. C., Gil-Gomez, G., Hegardt, F. G., and Haro, D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 18767–18772
- Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Laine, B., Fruchart, J.-C., Auwerx, J., and Staels, B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31012–31018
- Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Kosykh, V., Dallongeville, J., Fruchart, J.-C., Staels, B., and Auwerx, J. (1995) *J. Clin. Invest.* **96**, 741–750
- Hertz, R., Bishara-Shieban, J., and Bar-Tana, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13470–13475
- Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkison, W. O., Willson, T. M., and Kliwier, S. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12953–12956
- Lemberger, T., Staels, B., Saladin, R., Desvergne, B., Auwerx, J., and Wahli, W. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 24527–24530
- Steinegger, H. H., Sørensen, H. N., Tugwood, J., Skrede, S., Spydevold, Ø., and Gautvik, K. M. (1994) *Eur. J. Biochem.* **225**, 967–974
- Gwosdow-Cohen, A., Chen, C. L., and Besch, E. L. (1982) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **170**, 29–34
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156–159
- Miyazawa, S., Osumi, T., Hashimoto, T., Ohno, K., Miura, S., and Fujiki, Y. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 83–91
- Berry, M. N., and Friend, D. S. (1969) *J. Cell Biol.* **43**, 506–520
- Axelrod, J., and Reisine, T. D. (1984) *Science* **224**, 452–459
- McEwen, B. S., and Sapolsky, R. M. (1995) *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 205–216
- Alexandrova, M., and Farkas, P. (1992) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **42**, 493–498
- Weindenfeld, J., and Feldman, S. (1993) *Neuroendocrinology* **58**, 49–56
- Guillaume-Gentil, C., Rohner-Jeanrenaud, F., Abramo, F., Bestetti, G. E., Rossi, G. L., and Jeanrenaud, B. (1990) *Endocrinology* **126**, 1873–1879
- Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauca, M., Wahli, W. (1996) *Endocrinology*, in press
- McEwen, B. S. (1991) *La Presse Médicale* **20**, 1901–1806
- Dhabhar, F. S., McEwen, B. S., and Spencer, R. L. (1993) *Brain Res.* **616**, 89–98
- Newsholme, E. A., and Start, C. (eds) (1973) *Regulation in Metabolism*, pp. 293–323, John Wiley & Sons, New York

## PUBLICATION V

INDUCTION OF *ob* GENE EXPRESSION BY CORTICOSTEROIDS  
IS ACCCOMPANIED BY BODY WEIGHT LOSS  
AND REDUCED FOOD INTAKE

Piet De Vos, Régis Saladin, Johan Auwerx, et Bart Staels

J. Biol. Chem., 1995, 270, 15958-15961

## Induction of *ob* Gene Expression by Corticosteroids Is Accompanied by Body Weight Loss and Reduced Food Intake\*

(Received for publication, May 3, 1995)

Piet De Vos, Régis Saladin, Johan Auwerx, and Bart Staels†

From the Laboratoire de Biologie des Régulations des Eucaryotes, Département d'Athérosclérose, Institut Pasteur, 59019 Lille Cédex, France

**Genetic studies in mice have identified the *ob* gene product as a potential signaling factor regulating body weight homeostasis and energy balance. It is suggested that modulation of *ob* gene expression results in changes in body weight and food intake. Glucocorticoids are shown to have important metabolic effects and to modulate food intake and body weight. In order to test the hypothesis that these metabolic effects of glucocorticoids are linked to changes in the expression of the *ob* gene, *ob* mRNA levels were evaluated in rats treated with different glucocorticosteroids at catabolic doses and correlated to the kinetics of changes in body weight gain and food intake. Results from time course experiments demonstrate that adipose tissue *ob* gene expression is rapidly induced by glucocorticosteroids. This induction is followed by a concordant decrease in body weight gain and food consumption. These data suggest that the catabolic effects of corticosteroids on body weight mass and food intake might be mediated by changes in *ob* expression. Modulation of *ob* expression may therefore constitute a mechanism through which hormonal, pharmacological, or other factors control body weight homeostasis.**

Obesity, which can be defined as a body weight more than 20% in excess of the ideal body weight, is a major health problem in Western societies, since it is associated with an increased risk for cardiovascular disease, diabetes, and an increased mortality rate (1). Obesity is the result of a positive energy balance, as a consequence of an increased ratio of caloric intake to energy expenditure. The molecular factors regulating food intake and body weight balance are incompletely understood. Five single-gene mutations resulting in obesity have been described in mice, implicating genetic factors in the etiology of obesity (2). In the *ob* mouse a single gene mutation, *obese*, results in profound obesity, which is accompanied by diabetes (3). Cross-circulation experiments have suggested that *ob* mice are deficient of a blood-borne factor regulating nutrient intake and energy metabolism (4). Using positional cloning technologies, the mouse *ob* gene, and subsequently its

human homologue, have been cloned recently (5). Amino acid sequence analysis revealed a high degree of homology between mouse and human *ob*, indicative of an important regulatory function of this protein. The *ob* gene is exclusively expressed in white adipose tissue, suggesting that the protein can best be imagined as a fat-derived satiety factor. *ob* mice either have a non-sense mutation, resulting in the production of a non-functional gene product (C57BL/6J *ob/ob*), or carry a genomic mutation resulting in the complete absence of *ob* mRNA (SM/Ckc<sup>-Dac</sup>-*ob*<sup>2J</sup>/*ob*<sup>2J</sup>) (5). *ob* mRNA levels are highly increased in C57BL/6J *ob/ob* mice, suggesting that the level of expression of this gene signals the size of the adipose depot in an attempt to maintain body weight homeostasis.

The aim of the present work was to identify factors regulating *ob* gene expression and to evaluate whether changes in *ob* gene expression are correlated with changes in food intake and body weight. Since pharmacological doses of glucocorticoids have a strong catabolic action, the effects of high doses of glucocorticoids on the expression of the *ob* gene were studied and correlated to changes in body weight and food intake. The rat was chosen as a model, since body weight and adipose tissue mass keep increasing throughout its entire lifespan, thereby resembling the human situation of adult onset obesity. Furthermore, the relative short lifespan of this animal permits the study of factors affecting body weight homeostasis in a relatively short time period. The results from our studies demonstrate that administration of pharmacological doses of glucocorticoids induces adipose tissue *ob* gene expression. This induction is accompanied by reduced food intake and decreased body weight gain in these animals. These data indicate that modification of *ob* gene expression is subject to hormonal/pharmacological regulation, leading to the modulation of caloric intake and body mass gain.

### MATERIALS AND METHODS

**Animals and Treatments**—Eighty-day-old male rats received once daily subcutaneous injections with the indicated corticosteroids at a dose and for the period of time indicated. Control animals received saline only. Rats were group-housed and accustomed to a 12:12 h day-night illumination cycle. Animals were allowed free access to standard rat chow. Body weight (per animal) and food consumption (per treatment group) were measured at regular intervals throughout the experiment. At the end of the experiment, animals were killed between 9 and 10 a.m. by exsanguination while under ether anesthesia. Epididymal fat pads were removed immediately and frozen in liquid N<sub>2</sub>.

**RNA Analysis**—Total cellular RNA was prepared by the acid guanidinium thiocyanate/phenol-chloroform method (6). Northern and dot blot hybridizations of total cellular RNA were performed as described previously (7). A mouse *ob* cDNA fragment spanning nucleotides +50 to +659 was cloned from adipose tissue by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification (sense primer: 5'-CCA AGA AGA GGG ATC CCT GCT CCA GCA GC-3'; antisense primer: 5'-CCC TCT ACA TGA TTC TTG GGT ACC TGG TGG CC-3') (5). The resulting polymerase chain reaction fragment was cloned into pBluescript KS, and sequence analysis revealed complete identity to the reported mouse *ob* cDNA sequence (5). A β-actin cDNA clone was used as a control probe (8). All probes were labeled by random primers (Boehringer Mannheim). Filters were hybridized to  $1.5 \times 10^6$  cpm/ml of each probe as described (7). They were washed once in 0.5 × SSC and 0.1% SDS for 10 min at room temperature and twice for 30 min at 65 °C and subsequently exposed to x-ray film (X-Omat AR, Kodak). Autoradiograms were analyzed by quantitative scanning densitometry (Bio-Rad GS670 densitometer) as described (7).

\* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† To whom correspondence should be addressed: L.B.R.E., Département d'Athérosclérose, Institut Pasteur, 1, rue du Prof. Calmette, 59019 Lille Cédex, France. Tel.: 33-20-877388; Fax: 33-20-877360.

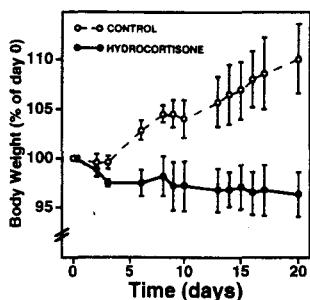


FIG. 1. Treatment with hydrocortisone reduces gain in body weight. Adult male rats received for the indicated number of days once-daily subcutaneous injections of hydrocortisone (100 µg/g of body weight). Control animals received saline only. Body weights were recorded at regular intervals and are expressed as a percentage of pre-treatment (day 0) body weight. Values represent the mean  $\pm$  S.D. of 4 animals/group.

#### RESULTS

To study the effects of pharmacological doses of glucocorticoids on body weight, food intake, and *ob* gene expression, 80-day-old male rats were treated once daily during 20 days with 100 µg of hydrocortisone/g of body weight. Sham-treated control rats exhibited a significant, steady gain in body weight throughout the treatment period, attaining approximately 110% of the initial body weight after 20 days (Fig. 1). Administration of hydrocortisone, however, completely prevented this gain in body weight and resulted in a slight decrease in body weight at the end of the treatment period (Fig. 1). This difference in body weight gain between control and treated animals became only gradually apparent; the first 2 days of treatment body weights did not differ significantly from controls, and only thereafter a gradually more pronounced difference was observed. Compared with untreated animals, hydrocortisone-injected animals consumed 10–15% less food throughout the entire treatment period (Fig. 2), indicating that a reduction of food intake may, at least in part, account for the lower gain in body weight after hydrocortisone treatment.

Since the *ob* gene product has been suggested to be a factor modulating food intake and energy utilization, the regulation of adipose tissue *ob* mRNA expression by hydrocortisone was determined next. Treatment with hydrocortisone increased *ob* mRNA levels more than 2-fold, an effect that was already maximal after 2 days (Fig. 3). *ob* mRNA levels remained elevated throughout the entire treatment period. This induction was specific, since  $\beta$ -actin mRNA levels remained constant throughout the entire treatment period (Fig. 3).

Corticosteroids are known to exert dual metabolic actions, reflected by a bitonic dose-response curve for body weight gain (9). In order to evaluate the dose-dependent effects of hydrocortisone on body weight and *ob* gene expression adult rats were treated once daily during 20 days with three different doses of hydrocortisone (1, 10, or 100 µg/g of body weight), respectively, corresponding to doses at the top, the middle, and the bottom of the descending arm of the body weight gain-corticosteroid dose-response curve (9). Treatment of adult rats for 20 days with different doses of hydrocortisone resulted in a dose-dependent reduction in body weight gain (Fig. 4A), which was accompanied by a dose-dependent induction of *ob* mRNA levels in adipose tissue (Fig. 4B).

Finally, the effects of the synthetic glucocorticoids dexamethasone and triamcinolone, which are relatively pure type II corticosteroid receptor agonists and produce a more pronounced monotonic negative dose-response curve of body weight gain (9), were analyzed and compared with hydrocortisone. Treatment of adult male rats during 4 days with triamcinolone or dexamethasone also resulted in a marked decrease

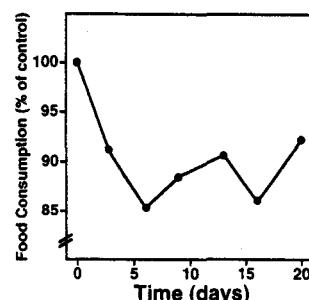


FIG. 2. Treatment with hydrocortisone reduces food intake. Adult male rats ( $n = 4$ /group) were treated as described under Fig. 1. Total food consumption of each treatment group was measured at regular intervals and is expressed as a percentage of the food intake of a group of sham-treated controls.

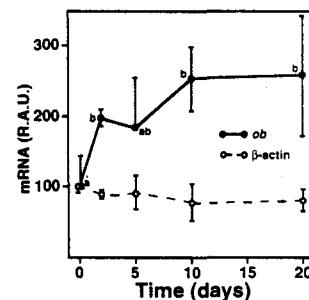


FIG. 3. Kinetics of induction of adipose tissue *ob* mRNA by hydrocortisone. Adult male rats ( $n = 4$ /group) were treated as described under Fig. 1. Adipose tissue was isolated, RNA was extracted, and *ob* and  $\beta$ -actin mRNA levels were measured as described under "Materials and Methods." Values represent the mean  $\pm$  S.D. of 4 animals and are expressed in relative absorbance units (R.A.U.) taking the pretreatment values as 100%. Statistically (analysis of variance,  $p < 0.05$ ) significant differences are observed between values followed by different letters ( $\beta$ -actin, not significant).

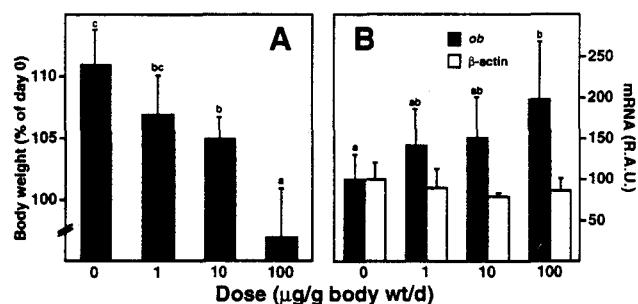
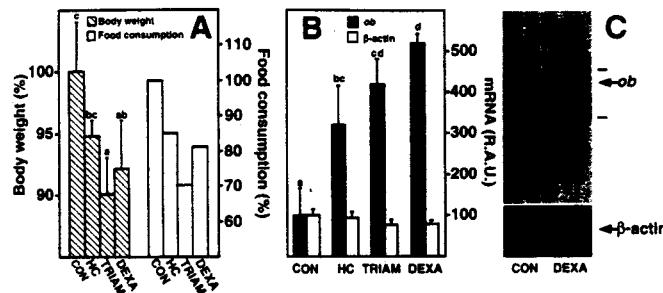


FIG. 4. Dose-dependent effects of hydrocortisone on body weight gain (A) and adipose tissue *ob* mRNA levels (B). Adult male rats ( $n = 4$  animals/group) received during 20 days once-daily subcutaneous injections of hydrocortisone at the indicated doses. Control animals received saline only. Panel A, body weights were recorded at the beginning and end of the experiment and are expressed as a percentage of pretreatment (day 0) body weight. Panel B, at the end of the experiment adipose tissue was isolated, RNA extracted, and *ob* and  $\beta$ -actin mRNA levels measured as described under "Materials and Methods." Values are expressed in relative absorbance units (R.A.U.) taking the controls as 100%. Values represent the mean  $\pm$  S.D. Statistically (analysis of variance,  $p < 0.05$ ) significant differences are observed between values followed by different letters ( $\beta$ -actin, not significant).

in body weight, which was paralleled by a similar decrease in food consumption (Fig. 5A). Concomitantly, *ob* mRNA levels increased after all three glucocorticoids tested (Fig. 5B). Northern blot hybridization analysis indicated that the *ob* cDNA probe hybridized to an mRNA of approximately 4.5 kilobases, a size similar to mouse adipose tissue *ob* mRNA (5). Furthermore, *ob* mRNA levels already increased 2.2-fold in rat adipose tissue within 24 h after one single injection of dexamethasone

Induction of *ob* Gene Expression by Corticosteroids

**FIG. 5. Influence of different corticosteroids on body weight, food consumption (A), and adipose tissue *ob* mRNA levels (B and C).** Panels A and B, adult male rats ( $n = 3$  animals/group) were treated for 4 days with vehicle (CON), hydrocortisone (HC, 100  $\mu\text{g}/\text{g}$  of body weight/day), triamcinolone (TRIAM, 20  $\mu\text{g}/\text{g}$  of body weight/day), or dexamethasone (DEXA, 3.7  $\mu\text{g}/\text{g}$  of body weight/day). Body weights and food consumption were recorded at the end of the experiment and are expressed as a percentage of the controls (Panel A). Adipose tissue was isolated, RNA extracted, and *ob* and  $\beta$ -actin mRNA levels measured as described under "Materials and Methods" (Panel B). Values are expressed in relative absorbance units (R.A.U.) taking the controls as 100%. Values represent the mean  $\pm$  S.D. Statistically (analysis of variance,  $p < 0.05$ ) significant differences are observed between values followed by different letters ( $\beta$ -actin, not significant). Panel C, adult male rats ( $n = 3$  animals/group) were sacrificed 24 h after a single injection of dexamethasone (DEXA; 3.7  $\mu\text{g}/\text{g}$  of body weight) or vehicle (CON). Total RNA (10  $\mu\text{g}$ ) extracted from individual animals was pooled and subjected to electrophoresis, transferred to a nylon membrane, and hybridized consecutively to labeled *ob* (top panel) or  $\beta$ -actin (bottom panel) cDNA as described under "Materials and Methods." The positions of the 18 and 28 S rRNA bands are indicated on the right of the top panel.

(Fig. 5C), thereby indicating that the induction of *ob* gene expression by corticosteroids is a very rapid event.

#### DISCUSSION

Genetically obese *ob* mice display a marked increase in body and adipose tissue mass and a pronounced hyperphagia. The cloning of the mouse and human *ob* genes and the demonstration that the *ob* gene is exclusively expressed in white adipose tissue and markedly increased in C57BL/6J *ob/ob* mice suggest that the level of expression of this gene correlates with the size of the adipose depot. The *ob* gene product may therefore function as part of a pathway regulating body fat mass and food intake. An increase in the *ob* signal may act directly or indirectly on the central nervous system to inhibit food intake and/or regulate energy expenditure as part of a homeostatic mechanism to maintain body weight balance. It is therefore conceivable that the level of *ob* expression is inversely correlated with food intake, energy expenditure, and the onset of obesity.

In an attempt to understand the regulation of the *ob* gene and the impact of its regulation on body weight and food consumption, we studied the effects of different corticosteroids at pharmacological doses, which provoke severe metabolic perturbations and a reduction in food consumption. Our results demonstrate that glucocorticoids induce *ob* expression in rat adipose tissue, whereas a gain in body weight and food intake decrease concomitantly. Although the existence of a correlation does not prove causality, several lines of evidence argue in support of a causal relationship between the induction of *ob* gene expression, on the one hand, and the decrease in food intake and body weight, on the other hand. First, the induction of *ob* gene expression is very rapid and nearly maximal within 24 h after a single injection of corticosteroids. By contrast, the changes in body weight follow much more gradually, the difference with sham-treated controls only becoming significant after 3 days of treatment. Taking into account that a 16-h overnight fast reduces the body weight of rats by approxi-

mately 7.5% (fed, 376  $\pm$  12 g; fasted, 350  $\pm$  10 g), it appears that the effects of corticosteroids on body weight changes are much more gradual and lag behind the induction of *ob* gene expression. Second, the induction of *ob* expression by corticosteroids is independent of food intake since it is observed regardless of whether animals are fed or fasted. Third, it is unlikely that the alterations in *ob* expression are secondary to the decrease in food intake and body weight, since *ob* mRNA levels are increased in hyperphagic C57BL/6J *ob/ob* mice. Finally, in contrast to normal mice, genetically obese *ob/ob* mice are dramatically resistant to glucocorticoid-induced weight loss (10), indicating that the presence of a functional *ob* gene product is required to transmit the glucocorticoid-induced weight loss. Therefore, it seems that the induction of *ob* expression after corticosteroid treatment precedes and probably provokes the observed alterations in food intake and body weight. In this respect it is interesting to note that plasma corticosterone levels are elevated in obese C57BL/6J *ob/ob* mice (11–13), which may, at least in part, explain the increase in *ob* mRNA levels observed in these mice (5).

Corticosteroids seem to exert a dual metabolic action on gain in body weight and feeding efficiency, strictly depending on the dose used (9). Administration of high doses of glucocorticoids, such as in this study, have a dramatic catabolic action, resulting in a marked decrease in food intake and body weight. In contrast, administration of lower doses of corticosteroids has an anabolic activity, which is accompanied by increased appetite in humans and stimulation of food intake in laboratory animals. However, in contrast to their catabolic effects, it is unlikely that the anabolic effects of glucocorticoids, observed after administration of low doses, are mediated through changes in *ob* gene expression. Indeed, although *ob/ob* mice do not express a functional *ob* gene product, adrenalectomy reduces food intake and normalizes energy balance (14–16), whereas corticosteroid replacement therapy restores food intake in these adrenalectomized *ob/ob* mice (17). This unequivocally proves that the anabolic action of steroid hormones is *ob*-independent.

The effects of corticosteroids on *ob* gene expression may be due to a direct action of these hormones on *ob* gene transcription. Alternatively, these hormones may have indirect effects. Administration of high doses of glucocorticoids may, for instance, influence the plasma concentrations of other hormones that regulate food intake, such as dehydroepiandrosterone or corticotropin-releasing hormone. Alternatively, high doses of glucocorticoids increase gluconeogenesis, predispose to diabetes, and may therefore increase plasma glucose concentrations. According to the glucostasis theory, decreased plasma glucose concentrations would be a signal, triggering food intake. Thus, glucocorticoids may act by increasing plasma glucose concentrations, which in its turn may induce *ob* gene expression resulting in a reduction of food consumption. In this case factors involved in glucose metabolism, such as glucose itself, glucagon, and insulin, would be expected to be important modulators of *ob* gene expression.

In conclusion, we have shown that *in vivo* glucocorticoid treatment induces *ob* gene expression. Our data suggest that modulation of *ob* expression is inversely correlated with alterations in food intake and body weight. Knowledge of the regulation of *ob* gene expression and factors implicated therein will therefore be important in the prevention and treatment of obesity.

**Acknowledgments—**We thank D. Cayet for excellent technical assistance and acknowledge the interesting discussions with Drs. M. Briggs, R. Heyman, R. Mukkerjee, J. Rosen, and J.-C. Fruchart.

## REFERENCES

1. Grundy, S. M., and Barnett, J. P. (1990) *Disease-a-Month* **36**, 641-731
2. Friedman, J. M., and Leibel, R. L. (1990) *Cell* **69**, 217-220
3. Friedman, J. M., Leibel, R. L., Siegel, D. S., Walsh, J., and Bahary, N. (1991) *Genomics* **11**, 1054-1062
4. Coleman, D. L. (1978) *Diabetologia* **14**, 141-148
5. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J. M. (1994) *Nature* **372**, 425-432
6. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156-159
7. Staels, B., and Auwerx, J. (1992) *Development (Camb.)* **115**, 1035-1043
8. Cleveland, D. W., Lopata, M. A., McDonald, R. J., Cowan, M. J., Rutter, W. J., and Kirschner, M. W. (1980) *Cell* **20**, 95-105
9. Devenport, L., Knehans, A., Sundstrom, A., and Thomas, T. (1989) *Life Sci.* **45**, 1389-1396
10. McGinnis, R., Walker, J., and Margules, D. (1987) *Life Sci.* **40**, 1561-1570
11. Dubuc, P. U. (1976) *Horm. Metab. Res.* **9**, 95-97
12. Herberg, L., and Kley, H. K. (1975) *Horm. Metab. Res.* **7**, 410-415
13. Naeser, P. (1974) *Diabetologia* **10**, 449-453
14. Solomon, J., and Mayer, J. (1973) *Endocrinology* **93**, 510-513
15. Solomon, J., Bradwin, G., Cocetta, H., Coffey, D., Condon, T., Garity, W., and Grieco, W. (1977) *Horm. Metab. Res.* **9**, 152-156
16. Yukimura, Y., and Bray, G. A. (1978) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **159**, 364-367
17. Saito, M., and Bray, G. A. (1984) *Am. J. Physiol.* **246**, R20-R25

## PUBLICATION VI

TRANSIENT INCREASE IN OBESE GENE EXPRESSION  
AFTER FOOD INTAKE OR INSULIN ADMINISTRATION

Régis Saladin, Piet De Vos, Michele Guerre-Millo, Armelle Leturque,  
Jean Girard, Bart Staels, et Johan Auwerx

Nature, 1995, 377, 527-529

## Transient increase in *obese* gene expression after food intake or insulin administration

**Régis Saladin\***, **Piet De Vos\***,  
**Michele Guerre-Millo†**, **Armelle Leturque‡**,  
**Jean Girard‡**, **Bart Staels\*** & **Johan Auwerx§**

\* Laboratoire de Biologie des Régulations chez les Eucaryotes,  
 INSERM U325, Institut Pasteur, 1 Rue Calmette,  
 F-59019 Lille, France

† INSERM U177, Institut des Cordeliers, 75006 Paris, France

‡ Ceremod CNRS UPR 1511, 92190 Meudon, France

OBESEITY is a disorder of energy balance, indicating a chronic disequilibrium between energy intake and expenditure<sup>1</sup>. Recently, the mouse *ob* gene<sup>2</sup>, and subsequently its human and rat homologues<sup>3-6</sup>, have been cloned. The *ob* gene product, leptin<sup>7</sup>, is expressed exclusively in adipose tissue, and appears to be a signalling factor regulating body-weight homeostasis and energy balance<sup>2,7-9</sup>. Because the level of *ob* gene expression might indicate the size of the adipose depot, we suggest that it is regulated by factors modulating adipose tissue size. Here we show that *ob* gene exhibits diurnal variation, increasing during the night, after rats start eating. This variation was linked to changes in food intake, as fasting prevented the cyclic variation and decreased *ob* messenger RNA. Furthermore, refeeding fasted rats restored *ob* mRNA within 4 hours to levels of fed animals. A single insulin injection in fasted animals increased *ob* mRNA to levels of fed controls. Experiments to control glucose and insulin independently in animals, and studies in primary adipocytes, showed that insulin regulates *ob* gene expression directly in rats, regardless of its glucose-lowering effects. Whereas the *ob* gene product, leptin, has been shown to reduce food intake and increase energy expenditure<sup>7-9</sup>, our data demonstrate that *ob* gene expression is increased after

food ingestion in rats, perhaps through a direct action of insulin on the adipocyte.

In C57BL 6J-*ob* mice a nonsense mutation results in the production of truncated, non-functional leptin<sup>1</sup>. Remarkably, *ob* mRNA is increased in these mice, suggesting that the absence of functional leptin activates regulatory mechanisms turning on *ob* gene expression. Similarly, in other animal models of obesity, such as C57BLKS-*db db* mice<sup>10</sup> and Zucker (*fa fa*)<sup>5</sup>, and ventromedial hypothalamus-lesioned rats<sup>6,10</sup>, *ob* mRNA levels are upregulated. These observations suggest that the level of *ob* gene expression indicates the size of the adipose depot in an attempt to maintain body-weight homeostasis, so *ob* gene expression should reflect the nutritional status of the animal. To test this hypothesis, we investigated whether changes in food intake modulate *ob* gene expression. Rats allowed food at night had adipose tissue *ob* mRNA levels that were twice those of animals fasted overnight (Fig. 1a, b). Because the onset of the night is associated with food intake in the rat<sup>11</sup>, diurnal changes in adipose tissue *ob* mRNA levels were next measured in rats with free access to food. We found that *ob* mRNA levels were lowest during the light cycle, increasing soon after the rats start eating (20:00), reaching a maximum around 4:00 (Fig. 1c, d). Thereafter, *ob*

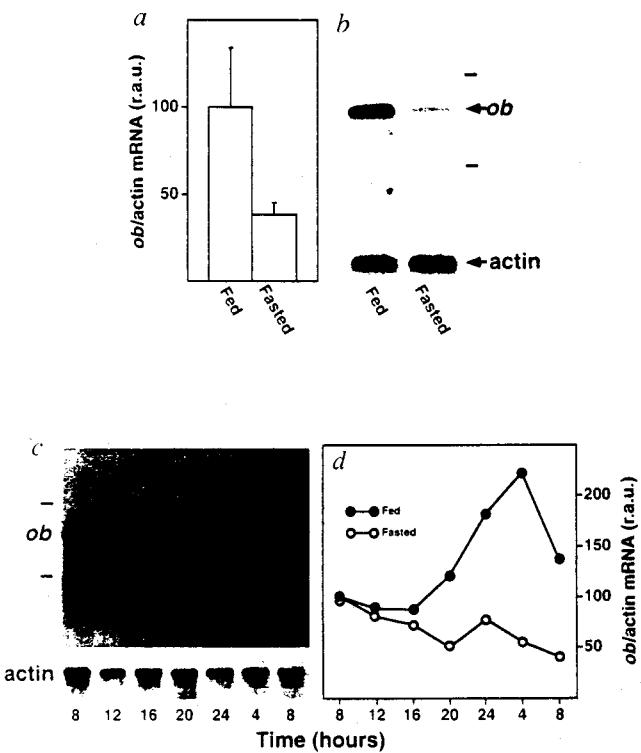


FIG. 1 Effect of fasting and diurnal rhythm on adipose tissue *ob* mRNA levels. a, Levels of *ob* mRNA, expressed as relative absorbance units (r.a.u.), in fasted and fed animals (mean  $\pm$  s.d.). b, Northern blot of adipose tissue *ob* and  $\gamma$ -actin mRNA levels in an overnight fasted and fed animal. c, Northern blot showing diurnal variation of *ob* and  $\gamma$ -actin mRNA levels in rats with free access to food. d, Comparison of adipose tissue *ob* mRNA between rats fed (filled circles) or fasted (open circles) during the diurnal cycle.

METHODS. Adult male Sprague-Dawley rats were group-housed and accustomed to a 12:12 h light:dark cycle (light from 8:00 to 20:00). Adipose tissue *ob* mRNA levels were compared between fed and overnight fasted animals. ( $n = 3$  per group). To determine the diurnal variation of *ob* gene expression, a rat ( $n = 4$  per group) was killed every 4 h for 24 h. The influence of food intake on the diurnal variation was measured by comparing *ob* mRNA expression between fed rats and rats having no access to food during this period. Rats were killed, epididymal adipose tissue RNA was prepared and analysed by northern and dot-blot hybridization as described<sup>14</sup>. A mouse *ob*<sup>14</sup> and a human  $\gamma$ -actin<sup>15</sup> complementary DNA clone were used as probes.

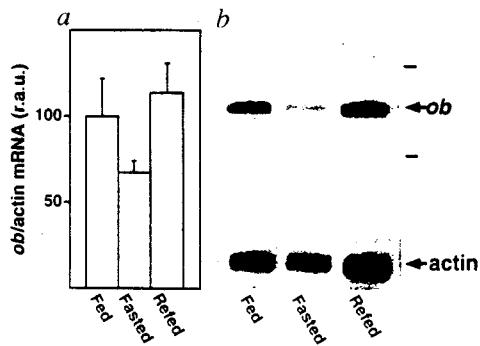


FIG. 2 The effects of acute food intake on *ob* mRNA levels in overnight-fasted rats. a, Levels of *ob*/actin mRNA. b, Northern blot of mRNA levels. METHODS. Rats were divided into 3 groups ( $n = 3$  each). A fed control group was allowed free access to food. Both other groups were denied access to food during the dark-light cycle. At the beginning of the light cycle, one group of fasted animals was given free access to food, whereas the other group served as a fasting control.

mRNA steadily decreased, reaching a minimum in the afternoon (Fig. 1c, d). To study whether this diurnal rhythmicity was linked to changes in food intake, *ob* mRNA levels were next analysed in fasted animals over a 24-hour period. Compared to fed animals, the increase in *ob* mRNA during the night was completely abolished when food intake was prevented (Fig. 1d). Although diurnal variations in biological parameters are often correlated with cyclic changes in hormone levels and/or light, the absence of the cyclic variation of *ob* mRNA expression in fasted rats suggests that the observed surge in *ob* mRNA is a consequence of feeding, instead of being linked to a diurnal rhythm. We therefore speculate that food intake causes a rapid increase in *ob* mRNA levels.

To study the causal role of food intake on *ob* gene expression, animals were fasted overnight and refed at the beginning of the light cycle. Levels of *ob* mRNA in fasted rats were half those in fed rats. Levels of *ob* mRNA were restored to levels of normally fed animals 4 hours after ingestion (Fig. 2). Because feeding increases plasma insulin concentrations, we tested whether the effects of food intake on *ob* expression are mediated by insulin. Therefore, overnight fasted animals received a subcutaneous insulin injection (1 IU), and 4 hours later levels of *ob* mRNA were compared with those in fasted and refed animals (Fig. 3).

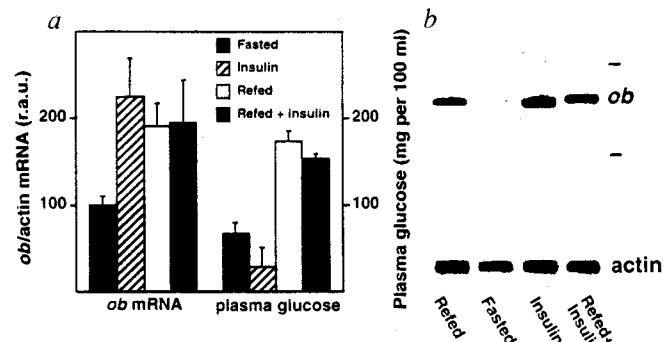
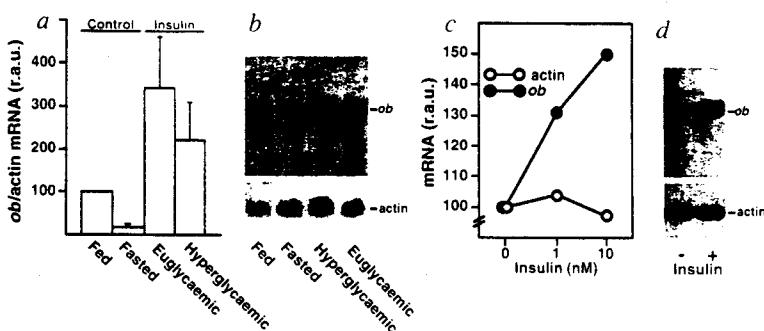


FIG. 3 Effects of insulin on *ob* mRNA levels in vivo. a, Effects of insulin, food intake, and insulin and food intake on *ob* mRNA levels in overnight-fasted rats. b, Representative northern blot. METHODS. Overnight fasted rats were divided into 4 groups ( $n = 3$  each). One group served as a fasting control, and the other three groups received either free access to food, a single subcutaneous injection of insulin (1 IU Actrapid HMg, Novo-Nordisk), or food and insulin.

**FIG. 4** Direct effect of insulin on *ob* mRNA expression. *a*, Graph depicting the effect of hyperglycaemic and euglycaemic hyperinsulinaemic clamps on *ob* mRNA. *b*, Northern blot comparing *ob* mRNA in rats subjected to hyperglycaemic and euglycaemic hyperinsulinaemic clamps to fasted and fed controls. *c*, Effect of different concentrations of insulin (1 and 10 nM) during 2 h on *ob* mRNA levels in primary rat adipocytes. *d*, Effect of 24 h exposure to insulin (100 nM) on *ob* mRNA expression in rat primary adipocytes.

**METHODS**. Hyperglycaemic and euglycaemic hyperinsulinaemic clamps were performed during 6 h in Wistar rats as described<sup>16</sup>. Briefly, porcine insulin was infused at a constant rate of 10 nmol kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Glucose levels were maintained at 96 ± 2 mg per 100 ml and 229 ± 4 mg per 100 ml in the euglycaemic and hyperglycaemic clamps, respectively, by a variable infusion of glucose. Glucose was determined every 5 min and insulin every hour during the clamp as described<sup>16</sup>. Adjustments of the glucose infusion were made to maintain glycaemia, as evident from the plasma glucose, and insulin levels: for the control (*n* = 7), 114 ± 10 mg per 100 ml and 46 ± 6 μU ml<sup>-1</sup>; for the euglycaemic hyperinsulinaemic clamp (*n* = 3), 96 ± 2 mg per 100 ml and



670 ± 80 μU ml<sup>-1</sup>; and for the hyperglycaemic hyperinsulinaemic clamp (*n* = 3), 229 ± 4 mg per 100 ml and 620 ± 70 μU ml<sup>-1</sup>. At the end of the clamp, rats were killed and adipose tissue RNA was prepared as described. Primary rat adipocytes cultured as described<sup>17</sup> were exposed to the indicated concentration of insulin or vehicle during 2 h (*c*) or 24 h (*d*). RNA was analysed as described above.

Insulin injection doubled *ob* mRNA levels compared to fasted controls so they were comparable to those in refed animals. Simultaneous injection with insulin and refeeding increased *ob* mRNA to a similar extent to insulin alone, indicating that insulin is sufficient to mimic the effects of food intake on *ob* expression. Because injection of insulin can be associated with counter-regulatory changes induced by the hypoglycaemic response to insulin, rats were rendered hyperinsulinaemic by subjecting them to both euglycaemic and hyperglycaemic hyperinsulinaemic clamps. Rats undergoing hyperinsulinaemic clamps, in which plasma glucose was respectively maintained at 96 ± 2 mg per 100 ml (slightly higher than fasting glucose levels, termed euglycaemic) or at 229 ± 4 mg per 100 ml (slightly higher than glucose levels after feeding, termed hyperglycaemic), showed a striking increase in *ob* mRNA levels relative to controls (Fig. 4*a*, *b*). These results demonstrate that the effect of insulin on *ob* gene expression is not due to changes in glucose concentrations. Finally, we investigated whether insulin affects *ob* mRNA expression in primary rat adipocytes. Consistent with the *in vivo* data, *ob* mRNA levels increased by up to 50% 2 hours after addition of insulin (1 and 10 nM; Fig. 4*c*). When primary adipocytes were exposed to a higher concentration of insulin during 24 hours, levels of *ob* mRNA were then doubled (Fig. 4*d*). This indicates that insulin has direct regulatory effects on adipocyte *ob* gene expression.

These data, together with the results of the diurnal variation and feeding studies, support a causal relationship between food intake, insulin levels, and *ob* gene expression. The close temporal relationship between these phenomena suggests that changes in feeding patterns regulate *ob* mRNA expression through an effect on insulin levels, which may explain the increased *ob* gene expression in hyperphagic hyperinsulinaemic animals, such as C57BL/6J-*ob*<sup>ob</sup> and C57BLKS-*db*<sup>db</sup><sup>10</sup> mice, Zucker (*fa fa*)<sup>5</sup>, or ventromedial hypothalamus-lesioned rats<sup>6</sup>. The reverse scenario, whereby *ob* controls food intake, is also probably true. Indeed,

late at night, when its levels are highest, *ob* probably acts as a satiety signal leading to a cessation of food intake and an increase in energy expenditure. Energy intake is tightly linked to energy expenditure by adaptive thermogenesis, which involves stimulation of heat production<sup>12</sup>. Teleologically, this mechanism helps mammals to maintain body weight homeostasis by conserving energy during periods of food deprivation and preventing obesity during periods of energy excess. The *ob* gene product, leptin, may be an important mediator in this process<sup>9</sup>. An increase in leptin (as seen after eating) inhibits further food intake and/or regulates energy expenditure as part of a homeostatic mechanism to maintain body weight<sup>9</sup>. Decreased leptin levels in fasted animals might induce a sensation of hunger and, more importantly could be a stimulus for energy conservation, enabling them to survive periods of food shortage<sup>9</sup>. It is therefore conceivable that the level of *ob* expression is correlated with food intake, energy expenditure and the onset of obesity. Interestingly, hyperproinsulinaemia with diminished active insulin levels, owing to a mutation in the gene for carboxypeptidase E, was recently observed in obese C57BLKS-*fat*<sup>fat</sup> mice<sup>13</sup>. Their diminished leptin levels might be due to the lower active insulin concentration, which might at least partly explain the obesity in these mice.

In conclusion, rat adipose tissue *ob* gene expression is regulated by feeding patterns, being reduced after fasting and increased after (re)feeding. Levels of *ob* mRNA are increased by insulin, indicating that insulin is an important mediator of the effects of food intake on *ob* expression. These data, together with our previous observation of the regulation of *ob* gene expression by glucocorticoids<sup>14</sup>, support the concept that *ob* gene expression is under hormonal control, which is expected for a key factor controlling body weight homeostasis and energy balance. Knowledge of the factors regulating *ob* gene expression should be of major importance in the prevention and treatment of obesity.

Received 14 August; accepted 7 September 1995.

- Grundy, S. M. & Barnett, J. P. *Disease-a-Month* **36**, 641–731 (1990).
- Zhang, Y. et al. *Nature* **372**, 425–432 (1994).
- Masuzaki, H. et al. *Diabetes* **44**, 855–858 (1995).
- Geffroy, S. et al. *Genomics* **28**, 603–604 (1995).
- Murakami, T. & Shima, K. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **209**, 944–952 (1995).
- Funahashi, T. et al. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **211**, 469–475 (1995).
- Halaas, J. L. et al. *Science* **269**, 543–546 (1995).
- Pelleymounter, M. A. et al. *Science* **269**, 540–543 (1995).
- Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R. & Burn, P. *Science* **269**, 546–549 (1995).

- Maffei, M. et al. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 6957–6960 (1995).
- Peret, J., Macaire, I. & Chanez, M. *J. Nutrition* **103**, 866–874 (1973).
- Jacquier, E. in *Obesity* (eds Björneröd, P. & Brodoff, B. N.) 130–135 (Lippincott, Philadelphia, 1992).
- Gazdar, A. F. et al. *Cancer Res.* **50**, 5488–5496 (1990).
- De Vos, P., Saladin, R., Auwerx, J. & Staels, B. *J. biol. Chem.* **270**, 15958–15961 (1995).
- Cleveland, D. W. et al. *Cell* **20**, 95–105 (1980).
- Postic, C. et al. *Diabetes* **42**, 922–929 (1993).
- Hajduch, E. J., Guerre-Millo, M., Hainaut, I. A., Guichard, C. M. & Lavau, M. M. *J. cell. Biochem.* **49**, 251–258 (1992).

**ACKNOWLEDGEMENTS.** We thank D. Cavet and D. Lagrange for technical assistance, and M. Briggs, R. Heyman, S. Miller, R. Mukherjee, J. Paterniti and K. Wong for discussion.