

Université de Lille 2
Année universitaire 2014/2015

Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et biologiques de Lille

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 19 juin 2015
par Roxane MANSOURI**

Fibrates : perspectives biologiques et cliniques

Membres du jury :

Président : Docteur BALDUYCK Malika, Maître de Conférences en Biochimie, HDR, Faculté de Pharmacie de Lille.

Assesseur : Docteur GERVOIS Philippe, Maître de Conférences en Biochimie, HDR, Faculté de Pharmacie de Lille.

Membre extérieur : Docteur GOUMIDI Louisa, PhD, Ingénieur de recherche, Institut Pasteur de Lille.



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :
Vice-présidents :

Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Professeur Alain DUROCHER
Professeur Régis BORDET
Professeur Eric KERCKHOVE
Professeur Eric BOULANGER
Professeur Frédéric LOBEZ
Professeur Damien CUNY
Professeur Benoit DEPREZ
Professeur Murielle GARCIN
Monsieur Pierre RAVAUX
Monsieur Larbi AIT-HENNANI
Monsieur Antoine HENRY

Directeur Général des Services :

Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :
Vice-Doyen, 1^{er} assesseur :
Assesseur en charge de la pédagogie
Assesseur en charge de la recherche
Assesseur délégué à la scolarité
Assesseur délégué en charge des
relations internationales
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante
Chef des services administratifs :

Professeur Damien CUNY
Professeur Bertrand DECAUDIN
Dr. Annie Standaert
Pr. Patricia Melnyk
Dr. Christophe Bochu

Pr. Philippe Chavatte
M. Thomas Morgenroth
Monsieur Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie

M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie

Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maitres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
Mme	HOUSSIN-THUILLIER	Pascale	Hématologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques

Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DROUET	Maryline	Pharmacie Galénique
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

REMERCIEMENTS

A notre Présidente, Madame Balduyck, Maître de Conférences en Biochimie à la Faculté de Pharmacie de Lille et Praticien Hospitalier en Biologie.

Je vous remercie d'avoir accepté de présider cette Thèse. C'est un réel honneur. Je vous remercie également pour votre soutien, votre écoute et vos nombreux encouragements durant mes années de recherche mais aussi pendant mes années d'études à la Faculté. Acceptez ici mes plus sincères remerciements et ma reconnaissance.

Monsieur le Docteur Gervois, Maître de Conférences en Biochimie à la Faculté de Pharmacie de Lille.

Vous m'avez fait confiance. Vous avez accepté de me former, de me guider et vous m'avez fait partager vos connaissances. Je vous remercie pour toutes les heures que vous avez consacrées à diriger cette recherche et pour tout ce que vous m'avez appris, pour votre rigueur et vos nombreux conseils. Ce fut un honneur et un plaisir de travailler à vos côtés pendant ces nombreuses années. Je vous en suis très reconnaissante.

Madame le Docteur Goumidi, Ingénieur de Recherche à l'Institut Pasteur de Lille.

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury. Je vous remercie également pour votre sympathie, votre gentillesse et votre clairesvoyance. C'est toujours un réel plaisir de vous écouter.

Un grand merci aux copains étudiants pour m'avoir accueillie dans leur clan. Ce fut d'une grande aide et bien agréable. Merci Audrey, Cécé, Anne-So, FloFlo, Greg, Cuv, Lolo, Cyp et les autres.

Merci Marie pour ta gentillesse...

RESUME DE LA THESE

PPAR α est un facteur de transcription qui appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. L'activation de PPAR α par ses ligands naturels (acides gras et dérivés d'acides gras) ou synthétiques (tels que les hypolipémiants de la famille des fibrates) induit l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. PPAR α est une cible pharmacologique pour la correction des dyslipidémies. Le mécanisme à la base de cette activité normolipémiante fait intervenir l'activation de gènes du métabolisme des lipides et est appelé « cisactivation ». Cette activité fait intervenir la fixation de PPAR α à l'ADN. PPAR α est aussi impliqué dans le contrôle de l'inflammation *via* la répression de l'expression de gènes de la réponse inflammatoire. Le mécanisme moléculaire sur lequel repose cette activité est appelé « transrépression » et fait intervenir des interactions protéines/protéines entre PPAR α lui-même et d'autres facteurs de transcription. L'activation de PPAR α a des effets anti-athérogéniques dans la mesure où cette protéine intervient à la fois dans la correction des dyslipidémies et dans l'atténuation de l'inflammation, c'est-à-dire des facteurs de risques de l'athérosclérose. La contribution relative des effets normolipémiants d'une part, et anti-inflammatoires d'autre part, dans l'atténuation et la progression de l'athérosclérose n'est pas, à ce jour, clairement définie. L'inflammation aiguë provoque une augmentation de la synthèse de protéines hépatiques, un processus appelé réponse de la phase aiguë. Les médiateurs qui stimulent la phase aiguë sont notamment représentés par les cytokines pro-inflammatoires TNF, IL-1 et IL-6, et par les endotoxines, en particulier le LPS induisant l'expression de ces cytokines. Des études précédentes ont mises en évidence une connexion entre les voies de signalisation de PPAR α et de L'IL-6 d'une part, et de PPAR α et de l'IL-1 d'autre part, *in vitro*. Dans une première partie, notre étude a abouti à la démonstration que PPAR α exerce un contrôle global de la phase aiguë induite par l'IL-6, l'IL-1 et le LPS chez la souris et que le contrôle de l'inflammation hépatique par PPAR α permet de diminuer les concentrations plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, PPAR α module l'exacerbation de la phase aiguë et limite la propagation des cytokines pro-inflammatoires d'origine

hépatique. Dans une seconde partie, nous avons étudié le contrôle de la phase aiguë de l'inflammation, et les perturbations métaboliques associées (hypertriglycémie), par PPAR α indépendamment de son effet normolipémiant *via* la cisactivation des gènes du métabolisme des lipides. Par une approche de génie génétique, des mutations de PPAR α ont été introduites de façon à obtenir une série de mutants de PPAR α dont certains sont incapables d'activer la transcription des gènes mais conservent leur capacité de transrépression c'est-à-dire à réprimer l'expression des gènes de l'inflammation. En d'autres termes, ces protéines modifiées présentent des fonctions dissociées, c'est-à-dire conservent une fonction anti-inflammatoire mais sont dénuées de fonction normolipémiante. Ce travail a permis de montrer tout d'abord que PPAR α contrôle la phase aiguë indépendamment de sa fixation à l'ADN. De plus, nos résultats suggèrent que l'hypertriglycémie induite au cours de l'inflammation systémique peut être atténuée par PPAR α *via* le contrôle des voies de signalisation des cytokines pro-inflammatoires de façon indépendante de l'activation de gènes cibles impliqués dans le catabolisme des lipides.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	8
RESUME DE LA THESE	9
TABLE DES MATIERES.....	11
LEXIQUE DES ABREVIATIONS.....	13
LISTE DES FIGURES	15
INTRODUCTION, CONTEXTE DE TRAVAIL.....	16
I- LE RECEPTEUR Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha (PPARα).....	17
I-1- Le gène codant pour PPAR α	17
I-2- Structure de la protéine PPAR α : Organisation en domaines fonctionnels.....	17
I-3- Distribution tissulaire de PPAR α	18
I-4- Mécanisme d'action de PPAR α	19
I-4-1 Transactivation	19
I-4-2- Transrépression	20
I-5- Modulation de l'activité de PPAR α	21
I-5-1- Le niveau d'expression	21
I-5-2- Modifications post-traductionnelles	22
I-5-3- Régulation de l'activité de PPAR α par les autres récepteurs nucléaires et les co-facteurs	22
I-5-4- Identification d'une isoforme tronquée	23
II- LES LIGANDS DE PPARα	23
II-1- Ligands endogènes naturels	23
II-2- Ligands exogènes naturels.....	23
II-3- Ligands synthétiques	24
II-4- Ligands synthétiques pharmacologiques : Les fibrates	24
II-4-1- Présentation	24
II-4-2- Mécanisme d'action	26
II-4-3- Propriétés pharmacocinétiques	26
II-4-4- Propriétés pharmacodynamiques	26

III-PPARα : EFFETS METABOLIQUES ET PHARMACOLOGIQUES	28
III-1- PPAR α et métabolisme des lipides et des lipoprotéines	28
II-3-1- PPAR α et métabolisme lipidique	28
III-1-2- PPAR α et métabolisme des lipoprotéines	31
III-1-2-1- PPAR α et triglycérides	31
III-1-2-2- PPAR α et HDL	32
III-1-2-3- PPAR α dans l'efflux et le transport inverse du cholestérol	33
III-1-3- PPAR α et métabolisme énergétique myocardique	34
III-1-4- PPAR α et adaptation au jeûne.....	34
III-2- Modulation de la réponse inflammatoire par PPAR α	35
III-2-1- PPAR α et inflammation vasculaire	35
III-2-2- PPAR α et phase aigüe de l'inflammation	37
III-2-2-2- PPAR α et CRP	38
III-2-2-3- PPAR α et fibrinogène	38
III-2-2-3- PPAR α et IL6	40
IV- PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE	41
IV-1- Première étude.....	41
IV-1-1- Contexte	41
IV-1-2- Objectifs	41
IV-1-3- Stratégie	41
IV-1-4- Conclusion	41
IV-2- Seconde étude :	67
IV-2-1- Contexte	67
IV-2-2- Objectifs	67
IV-2-3- Stratégie	67
IV-2-4- Conclusion	68
Perspectives thérapeutiques : concepts émergents	99
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	102

LEXIQUE DES ABREVIATIONS

ACCORD	Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes
ACO	AcylCoA Oxydase
AG	Acides gras
a.n	Accession number
AP-1	Activating protein -1
apo	Apolipoprotéine
APP	Acute Phase Protein
APR	Acute Phase Response
BIP	Bezafibrate Infarction Prevention Trial
CBP	CREB Binding Protein
CE	Cellules endothéliales
CML	Cellules musculaires lisses
CRP	Protéine C-réactive
C/EBP	CAAT Box/ Enhancer Binding Protein
CTE	Carboxy-terminal extension
DAIS	Diabetes Atherosclerosis Intervention Study
DBD	DNA Binding Domain
DR	Direct Repeat
FIELD	Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes
FXR	Farnesoid X Receptor
HDL	Retinoid X ReceptorHigh Density Lipoprotein
HG	Haptoglobine
HHS	Helsinki Heart Study
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
IL-	Interleukine
IDL	Intermediary density lipoprotein
IκB	Inhibitor κ B
LBD	Ligand Binding Domain
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-C	LDL-cholesterol

LOCAT	Lipid Coronary Angiography Trial
LPL	LipoProtein Lipase
LXR	Liver X Receptor
MCAD	Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MCV	Maladies Cardio-Vasculaires
N-CoR	Nuclear Receptor Corepressor
NF-κB	Nuclear Factor- κ B
NPC1L1	Niemann-Pick C1 Like 1
NR	Nuclear Receptor
PDK-4	Pyruvate Dehydrogenase Kinase-4
PPRE	PPAR Response Element
RXR	Retinoid X Receptor
SAA	Serum amyloid A
SENDCAP	St Mary's, Ealing, Northwick Park Diabetes Cardiovascular Disease Prevention
SnuRM	Selective Nuclear Receptor Modulators
SPPARM	Selective PPAR modulator
SRC-1	Steroid Receptor Coactivator-1
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SMRT	Silence Mediator of Retinoid and Thyroid receptors
TNF	Tumor necrosis factor α
TG	Triglycérides
VA-HIT	Veterans Affairs HDL Cholesterol Intervention Trial
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation en domaine fonctionnels de la protéine PPAR α .	18
Figure 2 : La transactivation. Mécanisme d'activation des gènes cibles.	20
Figure 3 : La transrépression. La répression génique par PPAR α .	21
Figure 4 : PPAR α accélère le catabolisme des acides gras .	30
Figure 5 : PPAR α dans le métabolisme des lipoprotéines.	34
Figure 6 : L'action anti-inflammatoire du PPAR α .	36
Figure 7 : PPAR α empêche la synthèse hépatique d'APP induite par l'IL-1.	40
Figure 8 : Schéma résumant la problématique de la première étude.	42
Figure 9 : Etude des propriétés anti-inflammatoires de PPAR α indépendamment de ces propriétés de transactivation	68
Figure 10 : Concept des ligands sélectifs des PPARs	101
Figure 11 : Concept des ligands co-agonistes des PPARs	102

INTRODUCTION, CONTEXTE DE TRAVAIL

L'activité d'une cellule est modulée de manière réversible par des signaux chimiques issus d'autres cellules de l'organisme (hormones, facteurs de croissance, cytokines...) ou du milieu environnant (aliments, toxiques, métaux lourds).

Dans la cellule, il existe deux grandes voies de transmission des signaux jusqu'au génome. La première voie transfère les effets des médiateurs hydrosolubles ne pouvant traverser la membrane plasmique. Ces molécules agissent en se fixant à un récepteur logé dans la membrane plasmique et accessible en surface, celui-ci activant alors des cascades de réactions (phosphorylation, déphosphorylation, cyclisation, clivage enzymatiques de protéines) qui aboutissent à la modulation de l'activité de facteurs de transcription.

La seconde grande voie de transduction du signal transmet l'effet de médiateurs liposolubles tels que les hormones stéroïdiennes, thyroïdiennes et les acides gras. Ces molécules, qui peuvent entrer passivement dans la cellule, vont se fixer sur des récepteurs spécifiques, étant eux-mêmes aussi des facteurs de transcription reconnaissant des séquences d'ADN spécifiques. La fixation de l'hormone modifie alors l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs appelés Récepteurs Nucléaires dont le *Peroxisome Proliferator Activated Receptor α* fait partie. Les récepteurs nucléaires sont donc des facteurs de transcription activés par la fixation de ligands. En général, les ligands sont le plus souvent de petites molécules lipophiles qui entrent dans la cellule par diffusion passive. Cependant, certains récepteurs nucléaires ne possèdent pas de ligands identifiés et sont alors nommés récepteurs «orphelins». Notre thème de recherche principal est d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des gènes associés notamment à des facteurs de risques cardio-vasculaires que sont les dyslipidémies et l'inflammation. Ces travaux ont permis de démontrer l'intérêt thérapeutique de la modulation pharmacologique de l'activité du récepteur PPAR α .

I- Le récepteur *Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha* (PPAR α)

I-1- Le gène codant pour PPAR α

Le gène du récepteur PPAR α est localisé sur le chromosome 22 (22q12-22q13) chez l'Homme et sur le chromosome 15 chez la souris (modèle couramment utilisé pour l'étude de ce récepteur) (1, 2). Il est organisé en 6 exons codants dont un code le domaine A/B, deux, le domaine de liaison à l'ADN (*DBD ;DNA binding domain*), un, la région charnière et deux, le domaine de liaison du ligand (*LBD ;ligand binding domain*) et 3 exons non codants. Les structures des gènes *ppar α* humain et murin sont semblables à 85% et à 91% pour leur séquence protéique.

I-2- Structure de la protéine PPAR α : Organisation en domaines fonctionnels

PPAR α , comme les autres membres de la famille des récepteurs nucléaires, comporte une organisation en domaines fonctionnels.

- Le domaine A/B, situé dans la partie N-terminale de la protéine, est le domaine présentant le plus de variabilité, tant en terme de longueur que de séquence. Ce domaine contient la région de transactivation indépendante du ligand AF-1 (*activation function-1*) qui peut être activée par phosphorylation, par exemple en réponse à l'insuline.
- Le domaine C de liaison à l'ADN (*DBD*): ce domaine est fortement conservé. Il est constitué de deux structures en doigt de zinc qui permet à la protéine de se lier à l'ADN sur des séquences spécifiques nommées éléments de réponse aux PPAR : les **PPRE** (*PPAR Response Elements*). Il faut noter aussi la présence d'une région CTE (*C-terminal extension*) qui contient des déterminants structuraux nécessaires à la fixation au PPRE;
- La région charnière D;
- Le domaine E qui permet la fixation du ligand, situé en partie C-terminale et qui comprend la région d'activation transcriptionnelle (transactivation) dépendante du ligand (AF-2 ;*activation function-2*). Des études cristallographiques ont montré qu'il

abrite une large cavité hydrophobe dans laquelle se loge le ligand. Celle-ci apparaît plus large en comparaison avec celle d'autres récepteurs nucléaires, permettant au PPAR α d'interagir avec des ligands de structures très diversifiées (3). Par ailleurs, il existe, chez l'Homme une forme tronquée de PPAR α (issue d'un épissage alternatif) à laquelle il manque la région charnière et le LBD, et qui se comporte comme un dominant négatif, inhibant l'activité transcriptionnelle de la forme normale (4).

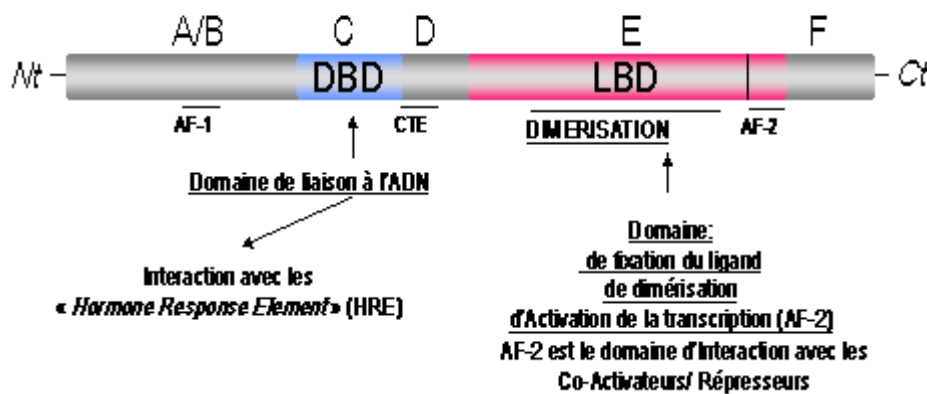


Figure 1 : Organisation en domaine fonctionnels de la protéine PPAR α

I-3- Distribution tissulaire de PPAR α

PPAR α est fortement exprimé dans les tissus impliqués dans la β -oxydation des AG tels que le foie, le cœur, le rein, le muscle (5, 6), les tissus impliqués dans la stéroïdogénèse ainsi qu'au niveau du tube digestif (7) et dans les kératinocytes (8).

PPAR α est aussi exprimé au niveau de la rétine, des glandes surrénales, du muscle squelettique, du pancréas (9,10) et, dans une moindre mesure, dans le cartilage (11), les testicules (12) et les ovaires (13). Chez l'Homme, PPAR α est exprimé dans le foie (14) permettant un traitement efficace de certaines dyslipidémies par les activateurs pharmacologiques de PPAR α . Il faut pourtant noter que son expression varie significativement d'un individu à l'autre (4).

PPAR α module la réponse inflammatoire et l'homéostasie lipidique dans différents types cellulaires de la paroi vasculaire telles que les cellules endothéliales (CE) (3, 15-16), les cellules musculaires lisses (CML) (17), ainsi que dans des types

cellulaires immunologiques telles que les lymphocytes T et les monocytes et macrophages 18).

Dans un contexte pathologique, PPAR α a pu être détecté dans les lésions d'athérosclérose humaine (19).

I-4- Mécanisme d'action de PPAR α

I-4-1 Transactivation

PPAR α peut réguler la transcription de gènes grâce à sa fixation à l'ADN. Ce mécanisme provoque l'activation transcriptionnelle des gènes cibles. Ce processus est couramment appelée « transactivation ».

En l'absence de ligand, PPAR α est capable d'interagir avec des co-répresseurs (tels que N-CoR ; *Nuclear Receptor Corepressor*) ou SMRT ; *Silence Mediator of Retinoid and Thyroid receptors*). Par contre, la présence du ligand induit un changement de conformation, ce qui permet l'interaction avec un système complexe de co-activateurs (tels que CBP ; *CREB Binding Protein*, SRC-1 ; *Steroid Receptor Coactivator-1*). Après activation par son ligand, PPAR α s'hétéro-dimérise obligatoirement avec RXR et se fixe en hétéro-dimère à l'ADN sur les éléments de réponse PPRE localisés dans les promoteurs de ses gènes cibles. Ces PPRE sont constitués de séquences hexamériques directes (DR, *Direct Repeat*) AGGTCA séparées par 1 (DR-1) ou 2 (DR-2) nucléotides et d'une région en 5' riche en A/T (20, 21) : **5'-C(A/G)(A/G)A(A/T)CT AGGTCA N AGGTCA-3'**

Dans le complexe formé sur l'ADN, PPAR α se fixe sur le demi-site en 5' du DR-1 alors que le RXR occupe celui en 3' (22) (Figure 2). De plus, la séquence nucléotidique flanquant le PPRE en 5' contribue à la spécificité de fixation d'un sous-type donné de PPAR (22, 23).

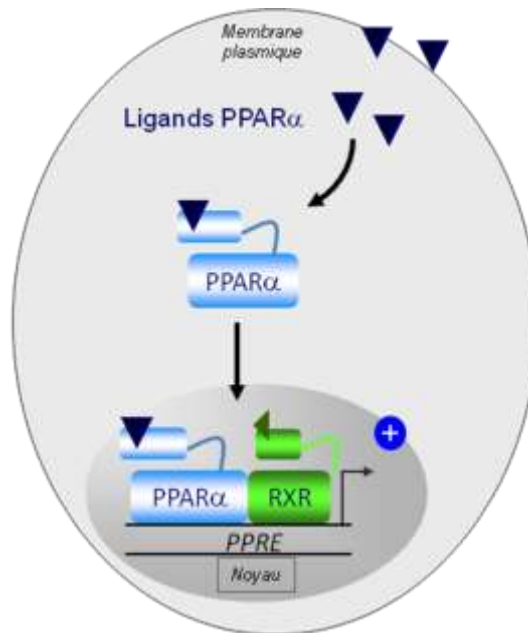


Figure 2 : La transactivation. Mécanisme d'activation des gènes cibles

I-4-2- Transrépression

Plusieurs travaux ont décrit PPAR α comme facteur capable de réprimer la transcription des gènes. Ce processus est appelé transrépression. En effet, PPAR α interfère négativement avec d'autres voies de signalisation telles que les voies de NF- κ B (complexe des facteurs de transcription p50 et p65), de AP-1 (complexe des facteurs de transcription Fos et Jun), de STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) et de C/EBP (*CAAT Box Enhancer Binding Protein*) et ceci de façon indépendante de sa fixation à l'ADN (24, 25-28). Ces interférences se produisent soit par des interactions protéines/protéines entre PPAR α lui-même et les facteurs de transcription des différentes voies, conduisant alors à la formation de complexes inactifs, soit par la séquestration de cofacteurs de la transactivation (Figure 3). Par ailleurs, il a été montré que PPAR α augmente la transcription du gène codant I κ B (par un mécanisme dépendant de p65 et DRIP205), inhibiteur de NF- κ B. (29).

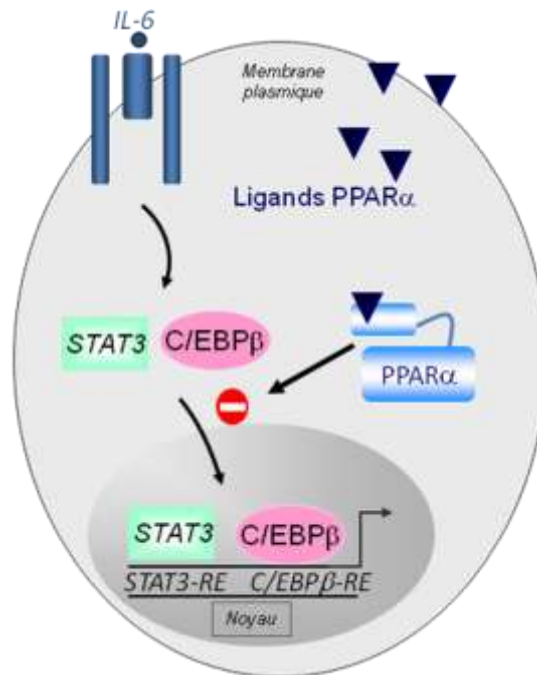


Figure 3 : La transrépression. La répression génique par PPAR α s'opère par interaction physique avec d'autres facteurs de transcription conduisant à la formation de complexes non fonctionnels (exemple de transrépression de la voie de l'interleukine 6 par PPAR α).

I-5- Modulation de l'activité de PPAR α

I-5-1- Le niveau d'expression

Chez le rat, l'expression de PPAR α est régulée par des hormones telles que les glucocorticoïdes, l'insuline et la leptine (30-32) et par des stimuli physiologiques tels que le stress, le jeûne ou le rythme nyctéméral (33). Bien que peu de données soient disponibles chez l'Homme, l'observation que l'expression de PPAR α varie chez l'Homme d'un sujet à l'autre suggère que ce récepteur est régulé au niveau transcriptionnel par des facteurs génétiques et environnementaux (4).

Il a été montré que, chez les rongeurs, le niveau d'expression de PPAR α est contrôlé par de nombreux paramètres physiologiques. Par exemple, l'expression hépatique de PPAR α est diminuée au cours de l'acclimatation au froid (34) et son expression pancréatique est réduite avec des concentrations élevées de glucose (35). Par contre, son niveau d'expression augmente avec le stress, l'administration de glucocorticoïdes (36) et le jeûne (37). De même, les acides biliaires augmentent

son expression (38). Enfin, son expression est également influencée par les hormones telles que l'hormone de croissance (39), les hormones sexuelles (40) et l'insuline (41).

I-5-2- Modifications post-traductionnelles

L'insuline augmente l'activité de PPAR α en augmentant sa phosphorylation par les MAP kinases (41). Par ailleurs, l'activité de PPAR α est diminuée lors de la phosphorylation par les kinases ERK-MAPK (42) et augmentée lors de la phosphorylation par les kinases p38-MAPK (43) et la protéine kinase A (44). De plus, PPAR α peut également être phosphorylé par les protéines kinases C (PKC) et la voie PKC fournit un mécanisme de régulation spécifique jouant un rôle « d'interrupteur » moléculaire pour les activités de transactivation et transrépression (45).

La concentration cellulaire de la protéine PPAR α est également régulée. Les activateurs de PPAR α inhibent son l'ubiquitinylation augmentant ainsi sa demi-vie (46).

I-5-3- Régulation de l'activité de PPAR α par les autres récepteurs nucléaires et les co-facteurs

D'autres récepteurs nucléaires peuvent entrer en compétition avec PPAR α en se fixant sur des éléments de type DR-1 et DR-2 et sont alors susceptibles de réguler la transcription d'un gène cible commun. De plus, la capacité de PPAR α à moduler la transcription de ses gènes cibles dépend de la présence et de la quantité des co-facteurs (co-activateurs ou co-répresseurs) et de la quantité de son partenaire d'hétéro-dimérisation RXR (47). De plus, des cofacteurs qui augmentent son activité transcriptionnelle, tels que RXR α ou CBP, induisent sa dégradation, alors que des cofacteurs qui inhibent son activité transcriptionnelle, tels que N-CoR, stabilisent PPAR α en diminuant son ubiquitinylation (48). Enfin, l'activité de PPAR α humain est induite par PPAR α lui-même et par le récepteur nucléaire HNF-4 (*Hepatic nuclear factor-4*) alors qu'elle est réprimée par COUP-TF II (*Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 2*) (49).

I-5-4- Identification d'une isoforme tronquée

Un variant de PPAR α qui donne naissance, chez l'Homme mais pas chez les rongeurs, à une isoforme tronquée de PPAR α notée PPAR α_{tr} a été identifiée (4). Il a été montré que le PPAR α_{tr} est capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle du PPAR α . Cela signifie que la régulation de l'expression des gènes cibles de PPAR α est altérée en fonction du rapport d'expression PPAR α /PPAR α_{tr} . Chaque fois que les deux formes de protéines PPAR α sont en présence, une compétition s'instaure et a pour conséquence une inhibition partielle de l'activité de la forme « normale ». La protéine PPAR α_{tr} est qualifiée de facteur « dominant négatif ». De plus, le niveau d'expression hépatique de PPAR α varie significativement suivant les individus alors que l'expression de PPAR α_{tr} semble subir peu de fluctuations.

II-LES LIGANDS DE PPAR α

II-1- Ligands endogènes naturels

L'OEA (Oleylethanolamide) se lie à PPAR α avec une haute affinité, induit la satiété et régule la prise de poids *in vivo* chez la souris de manière dépendante de PPAR α (50). PPAR α peut être activé par une multitude d'acides gras saturés, mono- ou polyinsaturés (51, 52). Il peut également être activé par les éicosanoïdes qui proviennent de l'oxydation de l'acide arachidonique par la lipooxygénase tels que le HETE (8(S)-HETE) et les leukotriènes (LTB₄) (51-54). De plus, les 9(S)- et 13(S)-HODE issus de l'action de la 15-lipooxygénase sur l'acide linoléique et les LDL oxydées peuvent également activer PPAR α (55).

II-2- Ligands exogènes naturels

AG alimentaires

Potentiellement tous les acides gras, y compris les acides gras saturés peuvent activer PPAR α au moins *in vitro*.

Les acides gras poly-insaturés alimentaires sont des activateurs naturels de PPAR α . Les affinités sont très variables et relativement faibles. Les acides gras oméga-6 et oméga-3 semblent être les plus actifs.

II-3- Ligands synthétiques

Différents types de molécules chimiques sont capables de se lier et d'activer PPAR α . Parmi celles-ci, les inducteurs de la prolifération des peroxyosomes (fibrates, esters de phtalates, herbicides) sont principalement des activateurs de PPAR α .

Des ligands de plus forte affinité et de meilleure sélectivité pour PPAR α ont été développés, tels que le GW7647 (56) ou le GW9578 (57).

II-4- Ligands synthétiques pharmacologiques : Les fibrates

II-4-1- Présentation

Les fibrates (phenoxy-isobutyrate) ou dérivés de l'acide fibrique, sont des ligands de faible affinité ($K_d \approx 20\mu M$) pour PPAR α (51-53).

Ils sont indiqués dans le traitement des dyslipidémies. Les dyslipidémies résultent d'une anomalie qualitative et quantitative d'un ou plusieurs lipides plasmatiques : Cholestérol total (CT) et ses fractions, HDL-cholestérol (HDL-c), LDL-cholestérol (LDL-c), triglycérides (TG).

Les dyslipidémies constituent un facteur de risque d'athérosclérose, une cause majeure de maladies cardio-vasculaires et notamment la maladie coronaire (à l'origine de l'infarctus du myocarde), l'accident vasculaire cérébral ischémique et l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs.

En France, 10 millions de personnes auraient un CT $\geq 2,5$ g/l, et 2 millions un CT ≥ 3 g/l (valeurs normales voir table 1).

Table 1 : Bilan lipidique normal chez un patient sans facteur de risque

Se Cholestérol :	4,10 - 5,20 mmol/L	1,6 - 2,0 g/L
Se Triglycérides :	0,40 - 1,70 mmol/L	0,35 - 1,50 g/L
Se Cholestérol HDL :	> 1,0 mmol/L	> 0,40 g/L
Se cholestérol LDL :	< 4,1 mmol/L	< 1,60 g/L

La prise en charge d'un profil lipidique perturbé doit s'inscrire dans la prise en charge du risque cardio-vasculaire global. Il existe ainsi une

gradation des objectifs thérapeutiques en fonction du nombre de facteurs de risques (âge, tabagisme, diabète, hypertension, dyslipidémies, sédentarité, obésité) ceux-ci regroupés sous le terme de « syndrome métabolique ». Des modifications du style de vie telles que l'arrêt du tabagisme, une activité physique suffisante, une alimentation équilibrée et une consommation d'alcool modérée sont essentielles dans un premier temps, et gardent évidemment aussi leur importance lors d'un traitement par des hypolipémiants.

Table 2 : Objectifs thérapeutiques (Se cholestérol LDL)

En présence d'un seul facteur de risque :	< 4,9 mmol/L	<1,9 g/L
En présence de 2 facteurs de risque :	< 4,1 mmol/L	<1,6 g/L
En présence de plus de 2 facteurs de risque :	< 3,4 mmol/L	<1,3 g/L
En cas d'antécédents cardio-vasculaire :	< 2,6 mmol/L	<1,0 g/L

Les fibrates sont utilisés pour diminuer les concentrations plasmatiques de lipides, lorsque les mesures hygiéno-diététiques ne sont pas suffisantes. Administrés sous forme d'acides ou d'esters, les fibrates sont bien absorbés par le tube digestif. Les esters sont hydrolysés en acides, seule forme active, par exemple le clofibrate est hydrolysé en acide clofibrique. Les acides se lient aux protéines plasmatiques. Ils peuvent déplacer les antivitamines K liés aux protéines plasmatiques.

Les fibrates en général, bien que n'ayant pas fait la preuve de leur efficacité en réduisant la mortalité globale au cours d'études comparatives, restent prescrits.

Le premier médicament de ce groupe, le clofibrate, dérivé de l'acide aryl-oxybutyrique, a été commercialisé à partir de 1965. D'autres dérivés dont la structure chimique présente une très grande ressemblance avec celle du clofibrate ont ensuite été commercialisés : le gemfibrozil, le fénofibrate, le ciprofibrate et le bésafibrate qui sont appelés « fibrates de deuxième génération ».

En France, 4 molécules appartenant à la classe des fibrates, utilisés en clinique dans le traitement des hypertriglycéridémies, disposent d'une autorisation de mise sur le marché nationale : le bezafibrate (**Befizal®** autorisé depuis 1982 – laboratoire Actavis Group PTC ehf), le ciprofibrate (**Lipanor®** autorisé depuis 1983 – laboratoire Sanofi Aventis + génériques), le fenofibrate (**Lipanthyl®**, autorisé depuis

1986-Laboratoire Fournier + génériques ; le gemfibrozil (**Lipur®** autorisé depuis 1982 – laboratoire Pfizer).

Gemfibrozil	LIPUR® Cp 450 mg
Fénofibrate	LIPANTHYL® Cp à 67, 145, 160 et 200 mg
Ciprofibrate	LIPANOR® Gélules à 100 mg
Bézafibrate	BÉFIZAL® Cp 200 et 400 mg

II-4-2- Mécanisme d'action

Les fibrates sont des agonistes de PPAR- α permettant ainsi de moduler l'expression génique de différentes enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique. Schématiquement, les fibrates agissent, au niveau plasmatique, en augmentant la lipolyse des lipoprotéines riches en triglycérides et, au niveau hépatique, d'une part en réduisant la synthèse des triglycérides par le foie et d'autre part, en stimulant la synthèse des apolipoprotéines (Apo) A1 et A2, ce qui augmentent les concentrations en HDL et le retour du cholestérol vers le foie.

II-4-3- Propriétés pharmacocinétiques

Les fibrates sont généralement bien résorbés par voie orale et sont fortement liés aux protéines plasmatiques et en grande partie métabolisés.

II-4-4- Propriétés pharmacodynamiques

Les fibrates abaissent la concentration plasmatique des triglycérides et celle des VLDL. La concentration des LDL peut baisser mais parfois augmenter.

Effets indésirables

Ont été rapportés :

- Des cas d'atteinte musculaire (myalgies diffuses) et exceptionnellement de rhabdomyolyse parfois sévères, réversibles à l'arrêt du traitement.
- Troubles digestifs, rashes cutanés, élévation des transaminases.

Indications thérapeutiques

Hypertriglycéridémies et hypercholestérolémies (type Ia).

Interaction et association

Potentialisation de l'effet des antivitamines K (déplacement de ses liaisons aux protéines plasmatiques).

Risque majoré de rhabdomyolyse en association avec les statines (inhibiteurs de l'HMG Co réductase) : Association déconseillée.

Comment prendre ces médicaments?

Certains de ces médicaments devraient être pris à l'heure des repas, habituellement lors du repas principal.

Positionnement thérapeutique

En 2005, le groupe de travail de pharmacovigilance de l'Agence européenne des médicaments (EMA) a procédé à la réévaluation des médicaments contenant des fibrates. En effet, chez les patients présentant une hyperlipidémie, l'efficacité des fibrates à long terme dans la diminution des événements cardiovasculaires (notamment infarctus et accident vasculaire cérébral) était moindre, comparée à l'efficacité des statines dans cette indication. Le groupe de travail européen avait alors conclu que les fibrates avaient cependant leur place dans le traitement de l'hyperlipidémie, mais qu'ils devaient être utilisés uniquement en deuxième intention. Ces conclusions du groupe de travail européen ont été remises en question par certains titulaires d'autorisations de mise sur le marché qui n'ont pas souhaité intégrer les modifications dans les résumés des caractéristiques des produits (RCP) concernés.

En 2009, à la demande de l'agence britannique (MHRA), le Comité des médicaments à usage humain (CHMP) de l'EMA a procédé à une nouvelle évaluation du rapport bénéfices/risques des fibrates. Leurs conclusions confirment celles du groupe de travail de pharmacovigilance rendues en 2005, qui recommandent l'utilisation des fibrates en deuxième intention, sauf chez les patients présentant de sévères hypertriglycéridémie ou ne supportant pas les statines. Le comité a néanmoins précisé que le fénofibrate pouvait être utilisé en association avec une statine, lorsque le traitement avec celle-ci n'était pas suffisant. Cette possibilité concerne spécifiquement les patients à haut risque cardiovasculaire présentant une hyperlipidémie mixte insuffisamment équilibrés par une statine seule.

Le traitement médicamenteux des troubles lipidiques dans le cadre de la prévention des maladies cardio-vasculaires repose sur les statines principalement. D'autres molécules sont également utilisées (voir annexe 1).

III-PPAR α : EFFETS METABOLIQUES ET PHARMACOLOGIQUES

III-1- PPAR α et métabolisme des lipides et des lipoprotéines

La démonstration que les fibrates, utilisés pour leurs propriétés hypolipémiantes, agissent en activant PPAR α a permis de comprendre le rôle joué par PPAR α dans le métabolisme lipidique. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* sur différents modèles de souris génétiquement modifiées montrent que PPAR α agit comme un senseur des niveaux d'acides gras et de leurs métabolites, et est ainsi capable d'adapter la réponse énergétique de l'organisme/de la cellule en modulant de nombreuses voies métaboliques.

II-3-1- PPAR α et métabolisme lipidique

Les graisses alimentaires sont tout d'abord absorbées au niveau intestinal avant d'être délivrées dans la circulation sanguine sous forme de chylomicrons. La Lipoprotéine Lipase (LPL), localisée sur la surface interne des vaisseaux, va permettre l'hydrolyse des TG en acides gras (AG) par la suite redistribués aux tissus périphériques. Le métabolisme hépatique des AG dépend, également, du statut énergétique et hormonal, et du taux d'AG « libres » circulants en provenance du tissu adipeux. Les AG peuvent être ré-estérifiés et redirigés vers la circulation sanguine sous forme de VLDL pour être utilisés par les tissus périphériques ou stockés dans le tissu adipeux. Par ailleurs, lorsque la glycémie est faible, les AG vont être dégradés par le foie et utilisés comme source d'énergie. Lors d'une dépense énergétique importante, au cours d'un exercice physique ou d'un jeûne prolongé, les AG sont convertis en corps cétoniques utilisés comme source principale d'énergie par les tissus périphériques.

Les effets des activateurs de PPAR α tels que les fibrates, sont dus, en partie, à la modulation d'expression de plusieurs gènes codant pour des enzymes impliquées dans le catabolisme des acides gras. Au niveau hépatique, en facilitant les différentes étapes du catabolisme des acides gras, les fibrates conduisent à la diminution de la quantité d'acides gras disponibles pour la synthèse des TG associés aux VLDL, contribuant ainsi à diminuer la concentration de TG plasmatiques. Ainsi, les activateurs de PPAR α facilitent :

- ✓ La capture cellulaire des acides gras libres en augmentant l'expression de gènes codant pour des protéines de transport chargées de l'entrée des acides gras dans les cellules telles que la FATP (*Fatty Acid Transport Protein*), la FAT/CD36 (*Fatty Acid Translocase*) et la L-FABP (*Liver-Fatty Acid Binding protein*) de façon tissu-spécifique (58, 59);

- ✓ L'estérification des acides gras en acyl-coA (empêchant ainsi les acides gras de sortir de la cellule) en augmentant l'expression du gène de l'ACS (*Acyl-CoA Synthase*) (59, 60);

- ✓ L'entrée des acides gras dans les mitochondries en augmentant l'expression du gène de la CPT-1 et de la CPT-2 dans le foie et le muscle (61-65). Ainsi, il a été montré la présence d'un PPRE dans le 1^{er} exon du gène de la CPT-1 musculaire humaine et la modulation du gène de la CPT-1 par les fibrates a été confirmée par la diminution d'expression de la CPT-1 dans les souris déficientes pour le PPAR α (61);

- ✓ La dégradation des acides gras par β -oxydation mitochondriale en induisant l'expression du gène de la MCAD (*Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*), de la VLCAD (*Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*), de la LCAD (*Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*), de la LCAS (*Long Chain Acyl-CoA Synthase*) et de la 3-cétoacylCoA thiolase (65-67);

- ✓ La dégradation des acides gras par β -oxydation peroxysomale en augmentant l'expression du gène de l'ACO (*Acyl-CoA Oxydase*), de l'enzyme bifonctionnelle et de la 3-cétoacyl-coA thiolase (68-70), produisant ainsi des acyl-CoA à chaînes plus courtes, capables d'entrer dans la mitochondrie ;

✓ La synthèse de corps cétoniques par augmentation des concentrations cellulaires en HMG-CoA synthase, enzyme clé de la cétogénèse (71).

La dégradation des AG à longues chaînes en métabolites de chaînes plus courtes, pouvant servir de substrats à l'oxydation peroxysomale, est assurée dans les microsomes par les cytochromes P450, en particulier par les enzymes de la famille CYP4A. L'expression hépatique des gènes codant pour certaines de ces enzymes est induite par les proliférateurs de peroxysome *via* un mécanisme dépendant de PPAR α , et des PPRE ont été identifiés dans le promoteur de ces gènes (72, 73). Il a été décrit que PPAR α est nécessaire à l'induction de ces gènes en condition de jeûne (74).

Ainsi, l'activation de PPAR α conduit à une augmentation de la dégradation des AG, et par conséquent à une disponibilité réduite des AG pouvant être incorporés sous forme de TG dans les VLDL, ce qui contribue à l'action normolipémiante des fibrates (Figure 4).

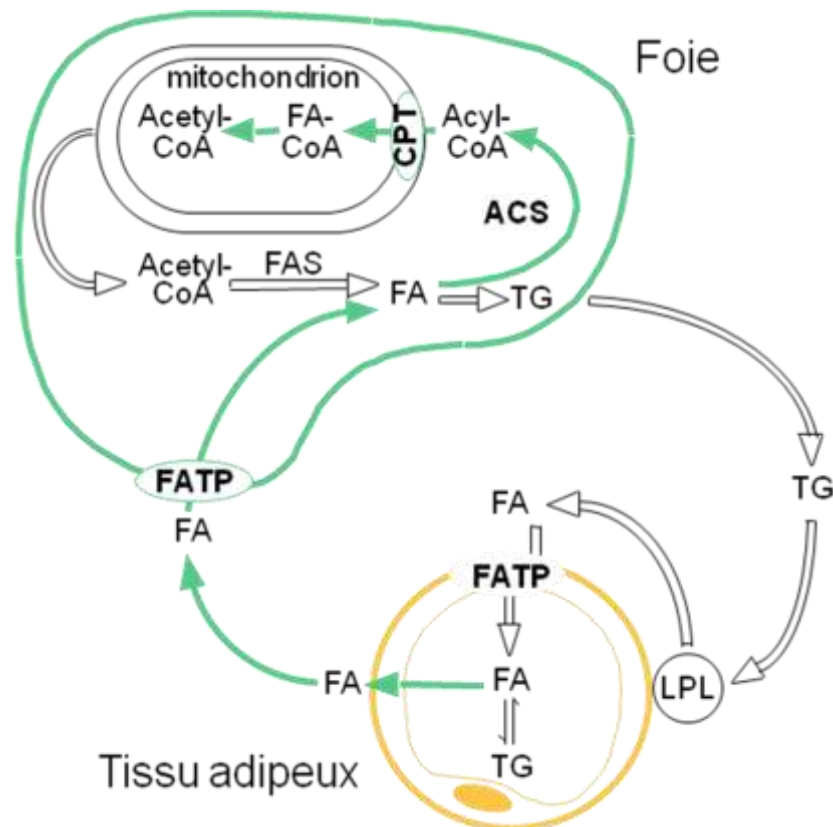


Figure 4 : PPAR α accélère le catabolisme des acides gras

AG, acides gras; TG, triglycérides ; VLDL, *Very Low Density Lipoprotein*

Les activateurs de PPAR α favorisent la néoglucogénèse en activant l'expression et l'activité de PDK-4 (*Pyruvate Dehydrogenase Kinase-4*) (enzyme qui inactive la pyruvate déshydrogénase en cas de jeûne ou de diabète), bloquant ainsi

l'oxydation du pyruvate en acétyl-coA et favorisant l'orientation du lactate et des acides aminés glucoformateurs vers la synthèse de glucose (75, 76).

Lors du jeûne, la glycémie est maintenue grâce à l'utilisation des stocks de glycogène puis de la néoglucogenèse hépatique. L'énergie nécessaire pour cette néoglucogenèse provient de la β -oxydation hépatique des acides gras, eux-mêmes issus de la lipolyse du tissu adipeux. Au cours du jeûne, l'expression de PPAR α est fortement induite dans le foie (36) ainsi que l'expression de ses gènes cibles codant pour des enzymes de β -oxydation des acides gras, suggérant un rôle essentiel de PPAR α dans cette adaptation au jeûne. L'implication de PPAR α en lui-même au niveau de l'utilisation des acides gras hépatiques a pu être mise en évidence par l'utilisation de souris déficientes en PPAR α . Alors que le phénotype de ces souris est modéré à l'état nourri, elles présentent, au cours d'un jeûne prolongé, un phénotype profondément altéré caractérisé par une hypoglycémie, une hypothermie, une hypocétonémie, une accumulation d'AG plasmatiques et une stéatose hépatique (37, 77). Ces souris présentent, en fait, une altération hépatique de la β -oxydation marquée par une absence d'induction de l'expression des gènes codant pour l'ACO et la MCAD ainsi qu'une absence d'augmentation des taux de β -hydroxybutyrate, reflétant une altération de la synthèse des corps cétoniques (37, 71, 77). De plus, elles présentent un métabolisme glucidique altéré au niveau du foie (78) et du tissu adipeux (79).

III-1-2- PPAR α et métabolisme des lipoprotéines

III-1-2-1- PPAR α et triglycérides

La concentration plasmatique de TG résulte d'un équilibre entre la synthèse de TG par le foie et l'élimination des lipoprotéines riches en TG. Chez l'Homme, il a été montré que les activateurs de PPAR α diminuent la synthèse hépatique de TG et augmentent leur catabolisme, réduisant ainsi la concentration plasmatique en TG.

Ainsi, les agonistes de PPAR α stimulent l'entrée des AG dans les mitochondries et leur β -oxydation, diminuant ainsi la quantité d'AG disponibles dans l'hépatocyte pour la synthèse de TG des VLDL. Ils influencent aussi l'assemblage des particules VLDL, induisant la production hépatique de lipoprotéines plus denses contenant de l'apoB (80).

Les agonistes de PPAR α augmentent le catabolisme des VLDL, grâce d'abord à l'activation des gènes codant pour l'apoA-V (81) et la LPL (82), augmentant alors l'activité lipolytique du plasma. De plus, les agonistes PPAR α diminuent l'expression tout du gène de l'apoC-III (83), inhibiteur de la LPL, ainsi que sa concentration plasmatique, mais le mécanisme par lequel la répression de l'apoC-III serait à l'origine de l'activité hypotriglycéridémiant des agonistes PPAR α n'est pas totalement élucidé. Il pourrait impliquer une diminution de l'expression d'un facteur activateur comme HNF-4 (84) ou induire l'expression de gènes de facteurs répresseurs comme Ear3/Coup-TF ou Rev-erba (85).

III-1-2-2- PPAR α et HDL

Chez l'Homme, les fibrates augmentent les concentrations plasmatiques des HDL et de leurs constituants protéiques majeurs, les apoA-I et apoA-II. PPAR α augmente la transcription des gènes codant pour ces deux apolipoprotéines en se fixant sur des PPRES présents dans leur promoteur (86, 87).

Le rôle de PPAR α dans le métabolisme des HDL a été démontré *in vivo* grâce à l'utilisation de souris déficientes pour PPAR α (88). Chez les rongeurs, l'administration de fibrates diminue les concentrations plasmatiques et l'expression hépatique du gène de l'apoA-I (88, 89). Cette différence entre espèces résulte de différences de séquence du promoteur du gène de l'apoA-I.

Des études menées *in vitro* ont montré que l'induction des ARNm de l'apoA-I humaine par les fibrates est dépendante de la fixation de PPAR α sur un PPRE fonctionnel situé dans le site A du promoteur. Chez les rongeurs, ce site n'est pas fonctionnel. Au contraire, l'expression du gène de l'apoA-I de rat est réprimée par les fibrates *via* un mécanisme mettant en jeu la fixation d'un autre récepteur nucléaire répresseur de la transcription, Rev-erba, sur un élément de réponse négatif (RevRE) (85), site qui n'est pas fonctionnel chez l'Homme.

Les fibrates affectent aussi le métabolisme des HDL en changeant l'expression d'enzymes et de récepteurs impliqués dans la synthèse et le catabolisme des HDL. Chez les rongeurs, les fibrates diminuent l'expression de la lipase hépatique (90), de la LCAT (91), et augmentent la taille des HDL en augmentant l'expression de la PLTP (92) et en diminuant la production de la protéine de SR-BI (93).

III-1-2-3- PPAR α dans l'efflux et le transport inverse du cholestérol

Des concentrations plasmatiques faibles d'apoA-I et de cholestérol-HDL sont des facteurs de risque importants dans le développement des MCV (94). Cette association est probablement due au rôle que jouent les HDL dans l'efflux de cholestérol à partir des cellules périphériques chargées en lipides et à son retour vers le foie où il sera excrété dans la bile.

PPAR α est présent dans les monocytes et macrophages (53). Les activateurs de PPAR α augmentent l'expression protéique du récepteur aux HDL CLA-1/SRB-I *in vitro* et *in vivo* dans les macrophages des lésions d'athérosclérose (54).

PPAR α augmente l'expression de ABCA1 dans les macrophages primaires humains, et l'efflux de cholestérol vers l'apoA-I est augmenté en présence d'activateurs de PPAR α (95). De plus, PPAR α régule le métabolisme intracellulaire du cholestérol dans les macrophages. En effet, son activation conduit à une diminution du rapport esters de cholestérol/cholestérol libre dans les macrophages, un effet dû à une réduction de l'activité de l'ACAT (*AcylCoA CholesterolAcyl Transferase*)-1 (96). Ceci permet de limiter l'accumulation d'esters de cholestérol dans les macrophages et d'augmenter la proportion en cholestérol libre disponible pour l'efflux. Ajoutées à l'augmentation de l'expression de ABCA1 et de l'apoA-I par les agonistes de PPAR α , ces données montrent que PPAR α joue un rôle essentiel dans l'homéostasie du cholestérol.

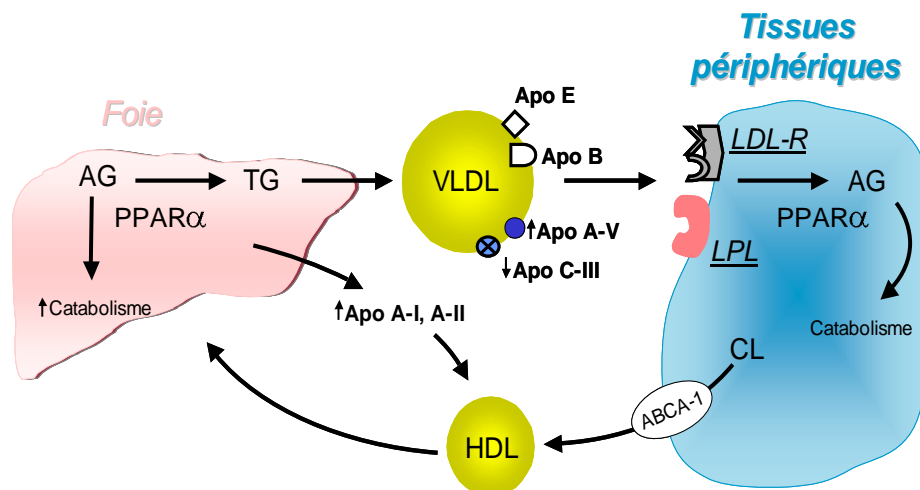


Figure 5 : PPAR α dans le métabolisme des lipoprotéines.

PPAR α dirige les AG vers les voies cataboliques dans le foie, diminuant le pool d'AG pouvant être incorporés dans les lipoprotéines riches en TG (VLDL). PPAR α diminue la synthèse hépatique de VLDL.

L'apoE et l'apoB sont des ligands pour le LDL-R.

PPAR α induit l'ApoA-V et réprime l'apoC-III, ce qui augmente l'affinité de la lipoprotéine pour sa lipolyse par la LPL.

PPAR α stimule le transport inverse du cholestérol empêchant ainsi son accumulation dans les tissus périphériques.

PPAR α augmente la synthèse hépatique de l'apoA-I et l'apoA-II, permettant une synthèse accrue d'HDL pour l'efflux de cholestérol des tissus périphériques et son retour au foie.

PPAR α induit l'ABCA-1 stimulant ainsi le transport inverse du cholestérol à partir du macrophage vers le foie.

(AG : Acides gras ; CL : Cholestérol libre ; LPL : Lipoprotéine lipase ; LDL-R : LDL récepteur ; Apo : Apolipoprotéine).

III-1-3- PPAR α et métabolisme énergétique myocardique

Le cœur est aussi un tissu capable d'oxyder les AG et, tout comme au niveau hépatique, cette voie est fortement régulée afin d'adapter l'entrée et l'utilisation des AG à la demande énergétique. Ici encore, PPAR α sert de « senseur » des AG et coordonne leur utilisation tant en conditions basales qu'en réponse à un stress. Tout comme il le fait au niveau hépatique, PPAR α régule l'expression des enzymes et des transporteurs participant à la β -oxydation des AG (42, 65, 77, 97).

III-1-4- PPAR α et adaptation au jeûne

L'expression de PPAR α est fortement augmentée en période de jeûne (36). Le jeûne stimule la lipolyse au niveau du tissu adipeux aboutissant à une augmentation des concentrations plasmatiques d'AG libres qui vont être rapidement pris en charge dans le foie où ils vont être métabolisés afin de produire les corps cétoniques, sources d'énergie pour les tissus extra-hépatiques gluco-dépendants.

III-2- Modulation de la réponse inflammatoire par PPAR α

III-2-1- PPAR α et inflammation vasculaire

Une première étude a démontrée que l'activation de PPAR α par le leukotriène B₄, un éicosanoïde pro-inflammatoire, conduit à sa propre dégradation et par conséquent à l'atténuation de la réponse inflammatoire. Une expérience complémentaire révéla une réponse inflammatoire prolongée dans des souris déficientes en PPAR α traitées au LTB₄ (54). Par la suite, on a pu démontrer qu'en activant PPAR α les fibrates inhibent la production de cytokines inflammatoires par les CML de l'aorte, telles que l'IL-6 et la prostaglandine 6-keto-PGF₁ α (17). Cet effet inhibiteur de PPAR α se traduit par le blocage de l'induction de l'expression de la cyclooxygénase-2 (Cox-2), un marqueur de l'inflammation des cellules vasculaires.

Le mécanisme d'action de PPAR α s'opère par interférence avec la voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B qui est activé par diverses voies de signalisation telles que celles de l'IL-1, du TNF, du lipopolysaccharide (LPS), des virus ou d'agents oxydatifs. Les cibles de NF- κ B sont des gènes codant pour des cytokines, des récepteurs des cytokines ou encore des molécules d'adhésion des leucocytes endothéliaux. Plusieurs études établissent que la forme activée de PPAR α interagit avec NF- κ B pour bloquer son activité transcriptionnelle ce qui se traduit par une inhibition de l'expression des gènes cibles pro-inflammatoires (98). (voir figure 6 page suivante)

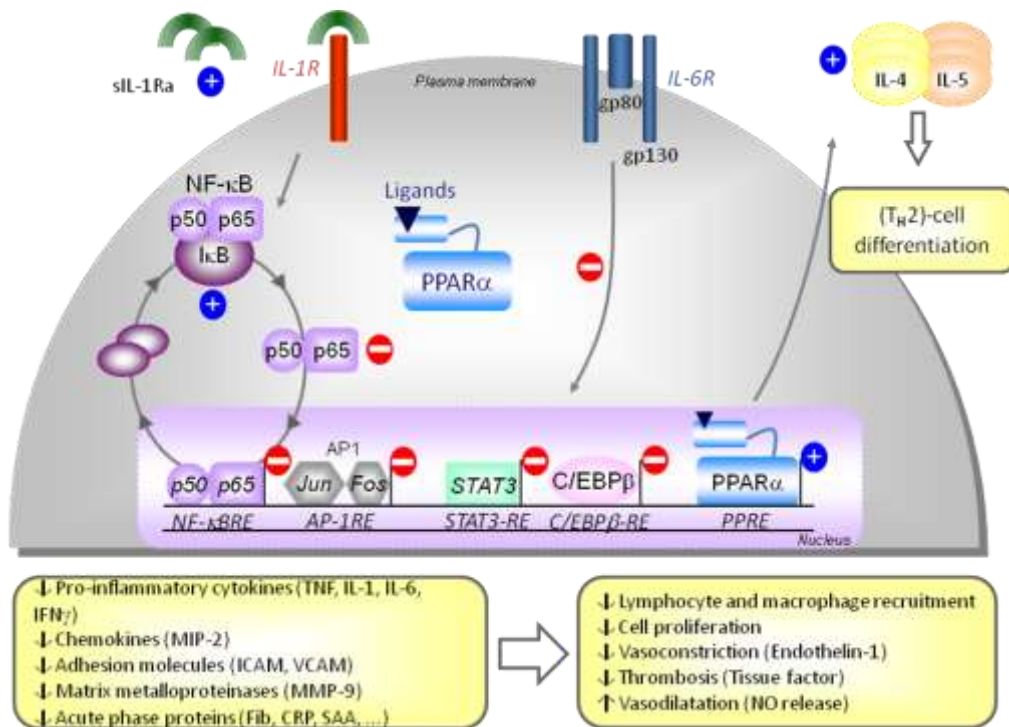


Figure 6 : L'action anti-inflammatoire du PPAR α dans la paroi vasculaire a été démontrée *in vivo*. Les aortes de souris déficientes en PPAR α présentent une réponse inflammatoire exacerbée à la stimulation par le LPS (24). De plus, l'induction de l'expression de l'IL-6 par le LPS est limitée par les fibrates uniquement dans des souris exprimant le PPAR α , ce qui démontre l'importance du récepteur pour l'action des fibrates et autres agonistes. Cet effet anti-inflammatoire des activateurs de PPAR α est également observé chez l'Homme. Deux groupes de patients présentant une légère hyperlipidémie ont été comparés quant à la réponse au fénofibrate. En plus de l'effet hypolipémiant attendu, ce traitement par le fénofibrate abaisse les concentrations plasmatiques de l'IL-6, deux fois plus élevées chez les patients coronariens (17). Tout ceci suggère fortement un effet anti-inflammatoire des agonistes de PPAR α en plus de leur action normolipémiante.

De surcroît, PPAR α interfère avec les mécanismes de chimiotactisme et d'adhésion cellulaire au niveau de l'endothélium. Ainsi, les activateurs de PPAR α inhibent l'expression de molécules d'adhésion qui interviennent dans le recrutement des leucocytes telles que VCAM-1 et ICAM-1.

III-2-2- PPAR α et phase aiguë de l'inflammation

L'inflammation aiguë systémique constitue une réponse défensive de l'organisme vis-à-vis d'agressions d'origines diverses : infections bactériennes, choc hémorragique, lésions tissulaires... En dehors du déclenchement de processus bien caractérisés (fièvre, hyperleucocytose, sécrétion de prostaglandines, d'ACTH, de cortisol), cette réponse associe des réactions cellulaires et biochimiques qui aboutissent à une libération accrue de nombreuses protéines (CRP, SAA : *Serum Amyloid A*, fibrinogène, haptoglobine, orosomucoïde, α 1-antitrypsine, α 1-glycoprotéine, céruléoplasmine) et à une diminution de la sécrétion pour quelques-unes d'entre elles (transferrine, albumine). Ces protéines, principalement d'origine hépatique, sont dites protéines de la phase aiguë de l'inflammation (APP : *Acute Phase Proteins*) (99). L'inflammation aiguë provoque une augmentation brutale, rapide, mais transitoire, de la synthèse des APP positives et une diminution modérée des APP négatives, suivie d'une normalisation de ces protéines lorsque la réparation est complète. En revanche, l'inflammation chronique conduit à une altération constante du profil d'expression de certaines ces protéines, avec des concentrations maintenues respectivement élevées ou diminuées pour les APP positives et négatives.

Les facteurs qui stimulent la phase aiguë sont notamment représentés par les cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1 et IL-6), et par les endotoxines, en particulier le lipopolysaccharide. Les cytokines pro-inflammatoires sont libérées dans la circulation principalement par les macrophages, les cellules endothéliales vasculaires, les fibroblastes et les hépatocytes et agissent sur les organes cibles *via* l'interaction avec des récepteurs spécifiques. Les données actuelles permettent de définir l'inflammation comme un processus déterminant dans la transformation des facteurs de risque en modification biologique au sein de la paroi vasculaire. Parmi les protéines de la phase aiguë de l'inflammation, plusieurs sont associées à l'athérosclérose en tant que « marqueurs de risque d'origine hépatique », la CRP et le fibrinogène étant les mieux caractérisées dans le contexte physiopathologique de l'athérosclérose et de ses complications.

III-2-2-2- PPAR α et CRP

La CRP est une autre protéine de la phase aiguë produite par le foie et considérée comme un important marqueur et par certains comme un facteur de risque indépendant pour les maladies cardiovasculaires.

La CRP est une protéine constituée de 5 sous-unités comportant chacune 206 acides aminés. Elle joue un rôle dans le système immunitaire, pouvant se fixer sur les immunoglobulines G et pouvant activer le système du complément. La CRP est un marqueur précoce, sensible et spécifique de la réaction inflammatoire augmentant proportionnellement à son intensité. Elle apparaît dans les six heures suivant l'inflammation aiguë. Son taux augmente et est maximal après deux jours. Il peut baisser en moins de 6 heures lorsque la source de l'inflammation a été éradiquée. En présence de calcium, la CRP se lie spécifiquement aux résidus phosphocholine retrouvée dans les polysaccharides microbiens. La CRP active par ce biais la voie classique du complément en l'absence d'anticorps, et opsonise les ligands, en vue de leur phagocytose. La phosphocholine étant également présente dans le PAF (*Platelet-Activating Factor*) et les polynucléaires, la CRP atténue la voie de la coagulation et l'activation des cellules inflammatoires. Chez des patients traités au fénofibrate, les concentrations plasmatiques en CRP sont diminuées.

En effet, il a été montré que l'expression de la CRP est abaissée par les activateurs de PPAR α dans les conditions basales et en conditions inflammatoires stimulées par l'IL-1 (100). La stimulation de la CRP par l'IL-1 dépend directement de la formation d'un complexe de protéines entre les facteurs de transcription C/EBP β et p50-NF- κ B. Lorsque le PPAR α est activé, l'expression des protéines C/EBP β et p50-NF- κ B est diminuée et la quantité moléculaire de complexe formé est abaissée. En conséquence, la stimulation de la transcription du gène de la CRP ne peut se faire de façon maximale.

III-2-2-3- PPAR α et fibrinogène

On appelle fibrinogène ou "facteur I" une protéine du plasma sanguin qui se transforme en fibrine lors de la coagulation sanguine. C'est une glycoprotéine de 340 kDa synthétisée au niveau hépatique et dans les mégacaryocytes. Cette glycoprotéine est soluble et présente à une concentration normale comprise entre 2,0 et 4,0 g/L dans le plasma humain. La transformation du fibrinogène en fibrine se fait sous l'action de la thrombine. Le fibrinogène soluble, une fois transformé en

fibrine, est insoluble dans le plasma sanguin. Il est possible de purifier le fibrinogène par précipitation à l'aide de glycine saturée. Son taux augmente dans les états inflammatoires.

Le fibrinogène, synthétisé par le foie, est une molécule dimérique composée de trois paires de polypeptides différents $A\alpha$, $B\beta$ et $G\gamma$. Le fibrinogène affecte fortement la coagulation sanguine, les paramètres rhéologiques du sang et l'agrégation plaquettaire. De plus, le fibrinogène et les métabolites qui en dérivent peuvent avoir un effet direct sur la paroi vasculaire. En effet, on a pu remarquer qu'au cours du processus d'athérosclérose, les plaques fibreuses qui se forment et qui provoquent la rigidification et l'obstruction progressive des vaisseaux touchés, étaient enrichies en produits de dégradation du fibrinogène. Le fibrinogène est classé parmi les protéines de la phase aiguë produites par le foie à haut niveau après stimulation par des cytokines inflammatoires (l'IL-6, l'IL-1 ou encore le TNF).

Un rôle potentiel anti-inflammatoire de $PPAR\alpha$ au niveau hépatique est fondé sur l'observation de l'abaissement des concentrations plasmatiques de fibrinogène et de CRP chez des patients traités au fénofibrate (17).

La biosynthèse du fibrinogène est fortement induite au cours de l'inflammation aiguë et ses concentrations plasmatiques sont élevées dans l'état inflammatoire chronique. Il est généralement admis que des concentrations élevées de fibrinogène plasmatique peuvent avoir des conséquences physiopathologiques, en particulier dans les complications thrombotiques de l'athérosclérose.

L'expression des gènes du fibrinogène est fortement stimulée par l'IL-6. Un pré-traitement par les fibrates prévient la stimulation de l'expression des gènes du fibrinogène par l'IL-6 et cet effet est amplifié par la sur-expression cellulaire de $PPAR\alpha$.

Le facteur de transcription C/EBP β est un puissant activateur de l'expression des gènes du fibrinogène et d'autres gènes de la réponse inflammatoire. Il agit en tant que médiateur de la voie de signalisation de l'IL-6. Une fois activé par son ligand, $PPAR\alpha$ interagit physiquement avec un cofacteur de transcription indispensable à l'action du facteur C/EBP β . Ce mécanisme d'action de $PPAR\alpha$ suffit à modérer la forte induction des gènes du fibrinogène provoquée par l'IL-6. Ainsi, $PPAR\alpha$ est un facteur important dans la suppression de l'expression du fibrinogène hépatique en conditions basales et inflammatoires (27).

III-2-2-3- PPAR α et IL6

PPAR α activé peut interférer négativement avec les voies de signalisation de certaines cytokines inflammatoires au niveau de la paroi vasculaire en bloquant l'activité des facteurs de transcription AP-1, STAT et NF- κ B (101, 102). De plus, l'étude de la répression de l'expression du fibrinogène par les fibrates a révélé que PPAR α peut bloquer l'effet de stimulation de l'IL-6 considérée comme un puissant régulateur de la phase aiguë au niveau hépatique (27). Ceci suggère fortement que l'activation du PPAR α ne réprime pas seulement l'expression du fibrinogène mais aussi d'autres protéines de la phase aiguë de l'inflammation. Il a en effet été montré que dans les souris stimulées par l'IL-6 et sous traitement par le fénofibrate, aucune induction des gènes cibles de l'IL-6 ne pouvait être observée. Les souris traitées uniquement par l'IL-6 présentaient une forte induction des ARN messagers des gènes du fibrinogène, de la sérum amyloïd A, de l'haptoglobine par comparaison avec les souris non traitées. L'implication indispensable de PPAR α dans ce blocage de la stimulation de la voie de signalisation de l'IL-6 a été démontrée par la répétition des expériences dans des souris déficientes pour PPAR α . En effet, le traitement de ces animaux par le fénofibrate n'a affecté en rien l'effet stimulateur de l'IL-6.

Une des étapes clés du contrôle des voies de signalisation est l'activation du récepteur qui orchestre la réponse aux stimuli. Le récepteur à l'IL-6 est un complexe de deux protéines qui sont appelées gp80 et gp130. Dans les souris sous traitement par le fénofibrate, l'expression de gp 80 et de gp 130 est abaissée (103) (voir figure 6 et 7). Ainsi, PPAR α est un modulateur de la synthèse d'APP.

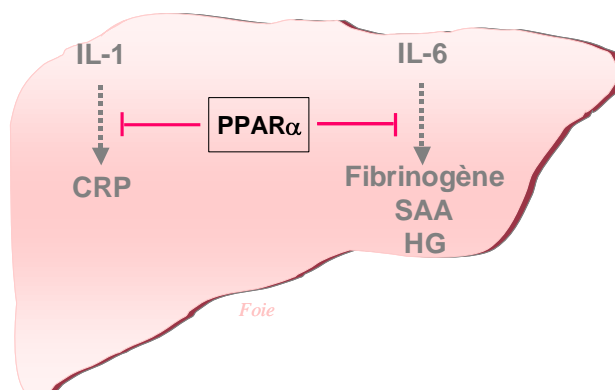


Figure 7 : PPAR α empêche la synthèse hépatique d'APP induite par l'IL-1 (CRP) ou par l'IL-6 (Fibrinogène, SAA et HG).

IV- PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE

IV-1- Première étude

IV-1-1- Contexte

PPAR α activé peut interférer avec les voies de signalisation de certaines cytokines inflammatoires au niveau de la paroi vasculaire en bloquant l'activité des facteurs de transcription AP-1, STAT et NF- κ B (140). L'analyse globale des données met en évidence une connexion entre les voies de signalisation de PPAR α et de L'IL-6 (*cf* Etude fibrinogène/PPAR α , APRPS/PPAR α) au niveau hépatique chez l'Homme. Ceci suggère fortement que l'activation du PPAR α ne réprime pas seulement l'expression du fibrinogène et de CRP mais aussi d'autres protéines de la phase aiguë de l'inflammation. Les facteurs qui stimulent la phase aiguë sont notamment représentés par les cytokines pro-inflammatoires TNF, IL-1 et IL-6, et par les endotoxines, en particulier le lipopolysaccharide.

IV-1-2- Objectifs

Notre étude a consisté à étudier la possibilité de la généralisation de la régulation hépatique des protéines de la phase aiguë produites en réponse à l'IL-1 et au LPS par PPAR α .

IV-1-3- Stratégie

Une première étude s'est attachée à analyser l'effet de l'activation de PPAR α dans le contrôle de la réponse à l'IL-1 et au LPS *in vivo* dans des souris normales et déficientes en PPAR α .

IV-1-4- Conclusion

Les résultats des expériences exposées ci-après démontrent que PPAR α hépatique contrôle la voie de signalisation de l'IL-1 en de l'endotoxine LPS.

En association avec les résultats déjà publiés sur le contrôle de la voie de l'IL-6 par PPAR α , ces travaux identifient PPAR α en tant que modulateur global de la phase

aiguë de l'inflammation. De plus, par son action hépatique, PPAR α permet la diminution de la concentration plasmatique des cytokines pro-inflammatoires circulantes atténuant la stimulation des cellules de la paroi vasculaire.

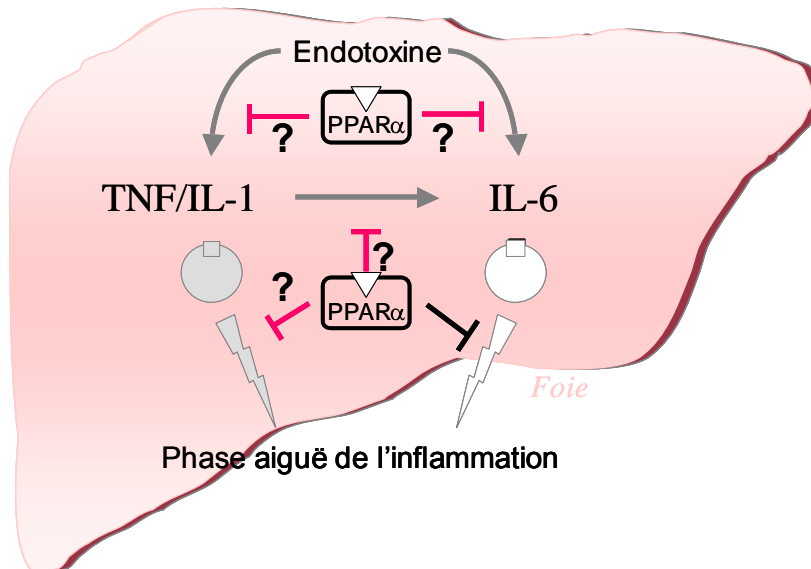


Figure 8 : Schéma résumant la problématique de la première étude

Rôle de PPAR α hépatique dans le contrôle général de la phase aiguë de l'inflammation

**Systemic and distal repercussions of liver-specific PPAR α
control of the acute phase response**

Endocrinology 149(6):3215–3223

Roxane Mansouri^{1,2,3}, Eric Bauge^{1,2}, Bart Staels^{1,2,3} and Philippe Gervois^{1,2,3}

¹Institut Pasteur de Lille, Département d'Athérosclérose, Lille, F-59019 France

²Inserm, U545, Lille, F59019 France

³Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Lille 2, Lille, F-59006 France

Corresponding author. Philippe GERVOIS, Laboratoire de biochimie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 3, rue du professeur Laguesse, BP83 F-59006, Lille, France

(philippe.gervois@univ-lille2.fr). Tel. 33 (0) 3 20 96 43 62. Fax. 33 (0) 3 20 96 49 11

Running title: Acute phase response control by PPAR α

Key words: Gene regulation, Inflammation, Cytokines, Hormone receptors, liver

Grants : Roxane Mansouri was supported by a grant from Région-Nord-Pas de Calais / Institut Pasteur de Lille and a grant from the Nouvelle Société Française d'Athérosclérose.

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche and Genfit SA (project acronym: COMAX.) the Région Nord-Pas de Calais/FEDER, the Fondation Coeur et Artères and the European Vascular Genomics Network.

Reprint requests to corresponding author.

Disclosure statement: The authors of this manuscript have nothing to declare

Summary

The acute phase response is characterized by the modulation of liver expression of many proteins involved in a diversity of biological functions. Among them, some are associated with the pathology of atherosclerosis. We previously found that Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha (PPAR α) agonists attenuate the IL-6 induction of acute phase response gene expression *in vitro* and *in vivo*. In the current work, we found a PPAR α -dependent regulation of hepatic acute phase response stimulated by IL-1. We also found that IL-1-stimulated expression of secondary wave cytokines such as IL-6 is prevented upon PPAR α activation in liver. Direct involvement of hepatic PPAR α was demonstrated using a liver-restricted expression of PPAR α in mice. IL-1 or IL-6 mediated acute phase response was inhibited by fenofibrate treatment in liver-specific PPAR α expressing mice but not in PPAR α -deficient mice. In addition, we demonstrated that PPAR α exerts a general control of the APR by using an inflammation/infection model of LPS. In such a context, liver-specific PPAR α expressing mice displayed lower circulating levels of TNF, IL-1 and IL-6 cytokines. We found a distal repercussion of this lowering at the vascular wall level as illustrated by a decreased expression of adhesion molecules in aorta. In conclusion, we demonstrated that through a specific liver action, PPAR α behaves as a modulator of systemic inflammation and of the associated vascular response.

Introduction

Even whether inflammation, mediated by varied set of cytokines (1), is crucial to the host defense, chronic inflammation or infection may become deleterious, especially for cardiovascular diseases. Especially, atherosclerosis is thought closely linked to inflammatory state (2). Prediction of the risk of developing atherosclerosis is based on the identification of risk factors and their modulation. Among them, haemostatic factors such as cytokines and their liver target genes are associated with an increased risk.

The acute phase response is an alarm response of the organism stimulated by drastic disturbances including, infection, inflammation, trauma, necrosis, and malignant growth. Among a diversity of biological functions, the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 (IL-1) and interleukin-6 (IL-6) are known to induce the acute phase response (APR). The APR corresponds to the gene modulation of acute phase proteins (APP) in liver among which are found fibrinogen, C-reactive protein (CRP), serum amyloid A (SAA) and haptoglobin (HG). Both cytokines and targets of the APR are considered as cardiovascular risk markers of hepatic origin (3-5). Inflammation and infection are accompanied by the secretion of TNF, IL-1 and IL-6 that activate either separate or common set of genes (6, 7). TNF/IL-1 belong to the primary wave of cytokines that trigger an immediate modulation of some of the APR target genes. In that context, IL-6 is an APP itself and belongs to the secondary wave of cytokines. Bacterial endotoxin such as LPS exhibits a broad spectrum of action and provokes a violent response from the entire organism. LPS may induce IL-6 expression and its plasma concentrations and launches TNF/IL-1 signaling which in turn stimulate and maintain the IL-6 response. Therefore, preventing exacerbation of cytokines stimulation either by controlling concentrations of plasma cytokines or by modulating cytokines signaling pathways might represent a strategy aimed at counteracting deleterious effects of systemic inflammation.

Among drugs affecting plasma acute phase proteins, fibric acid derivatives are reported as repressors. Fibrates are generally effective at normalizing hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia and may also lower fibrinogen and CRP plasma levels. Fibrates exert their action at the gene level through activation of the nuclear receptor *Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha* (PPAR α). The positive regulation of PPAR α target genes occurs through the binding of PPAR α with its heterodimeric partner RXR to specific response element (8-12). This pathway is mainly involved in the gene regulation of lipid and lipoprotein metabolism-related genes yielding to the normolipemic action of fibrates (13, 14). Furthermore, PPAR α was shown to down-regulate the expression of genes involved in the inflammatory process by interfering with several transcription factors such as STATs, C/EPBs, NF- κ B and AP-1 that are stimulated by pro-inflammatory cytokines (15, 16).

A role of PPAR α in modulating inflammation came from the initial observation that PPAR α deficient mice displayed a prolonged inflammatory response (17). The involvement of PPAR α in the control of inflammatory signaling was first demonstrated in vascular cells (15, 16, 18-22). Since PPAR α is highly expressed in liver, a potent function in the control of acute phase response was thereafter investigated. We previously found that fibrate-activated PPAR α negatively regulates IL-6-stimulated fibrinogen expression (16) and IL-1 stimulated CRP gene expression (19) in isolated primary human hepatocytes. We also reported that chronic activation of PPAR α attenuates IL-6-induced APR gene expression *in vivo* (18). Here, we show that IL-1-mediated stimulation of acute phase protein expression is counteracted by fibrate treatment *in vivo*. This effect occurs at the transcriptional level as demonstrated by run-on experiments. In addition we found that IL-1 stimulated expression of IL-6 in liver is prevented upon PPAR α activation. Finally, we demonstrated that PPAR α exerts a general control of the APR in inflammation and infection condition and lowers circulating concentrations of pro-inflammatory cytokines. This effect had a repercussion at the vascular level as demonstrated by a decreased expression of ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) and VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) in aorta.

Materials and Methods

Animal studies

Animal studies were performed in compliance with European Community specifications regarding the use of laboratory animals. The Nord-Pas de Calais Ethical Committee for animal use approved the animal experiments. C57Bl6/J mice were fed for two weeks with either a standard mouse chow or one containing 0.2% (w/w) fenofibrate. Mice were subjected to intra-peritoneal injection of IL-1 (0.5 μ g/mice) or saline buffer 3 hours before the sacrifice. Animals were killed by exsanguination under anesthesia. Livers and aorta were removed.

Preparation of nuclei and Run-on assay

Nuclei were prepared from fresh livers as described by Gorski *et al.* (23). Transcription Run-on assays were performed as described by Nevins *et al.* (24). Equivalent amounts of labeled nuclear RNA were hybridized for 48 hours at 42°C to 1 μ g of purified cDNA probes immobilized on Hybond C Extra filters (Amersham, Arlington Heights, IL). The following cDNAs were spotted: an ACO cDNA probe, a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNA probe, a serum amyloid cDNA probe, an haptoglobin cDNA probe. After hybridization, filters were washed at room temperature for 10 minutes in 0.5 \times SSC and 0.1% (w/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS), and twice for 30 minutes at 65°C, and subsequently exposed to x-ray (X-OMAT-AR, Eastman-Kodak, Rochester, NY) film.

RNA analysis

RNA from livers, primary mouse hepatocytes or aorta were extracted with *TRIzol* reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) using the supplier's instructions. Reverse transcription was realized on 1 µg RNA using random hexameric primers and Superscript reverse transcriptase (Invitrogen). cDNA levels were measured by real-time quantitative PCR using Brilliant SYBR Green Q-PCR Master Mix (Stratagene) on the Mx4000 detection system (Stratagene) using the specific primers. PCR amplification was performed in a total volume of 20 µL containing 100 nM of each primer. The conditions were 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C. For each primer pair, the linearity of the reaction was confirmed to have a correlation coefficient at 0.98 and a PCR efficiency of 100% over the detection area by measuring a 10-fold dilution curve with cDNA from mouse liver extract. Samples were analyzed in duplicate and normalized to the cyclophilin values as internal control. PCR was performed with oligonucleotides 5'-TTC TGC TCC CTG CTC CTG-3' and 5'-GTA ATT GGG GTC TTT GCC-3' for SAA; 5'-AAA AAC CTC TTC CTG AAC CAC-3' and 5'-AAC GAC CTT CTC AAT CTC CAC-3' for haptoglobin; 5'-GGC TCA GAC TCT GGG AAC TTT AG -3' and 5'-GAA CGA TGT GTG GTG CTT GTG -3' for fibrinogen- α ; 5'-AGC ACA GAA AGC ATG ATC CG -3' and 5'-CCC GAA GTT CAG TAG ACA GAA GAC-3' for TNF; 5'-CCA GTT GCC TTC TTG GGA CTG-3' and 5'-CAG GTC TGT TGG GAG TGG TAT CC-3' for IL6; 5'-GAA TGA CCT GTT CTT TGA AGT T-3' and 5'-TTT TGT TGT TCA TCT CGG AGC C-3' for IL-1; 5'-AAC CGA ATC CCC AAC TTG TGC AG-3' and 5'-TCT CCA GCT TCT CTC AGG AAA TGC C-3' for VCAM-1 and 5'-CCT GGC CTC GGA GAC ATT AGA GAA C-3' and 5'-ACC CCA AGG AGA TCA CAT TCA CGG-3' for ICAM-1. Quantification of mRNA expression was corrected using cyclophiline gene expression as a internal control with the primers 5'-GCA TAC GGG TCC TGG CAT CTT GTC C-3' and 5'-ATG GTG ATC TTC TTG CTG GTC TTG C-3'. Statistical analysis was performed using Student's *t* test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Isolation of primary hepatocytes

Hepatocytes were isolated from the livers of fed mice by a modification of the collagenase method (25). Hepatocytes were cultured in serum-free William's E medium (Invitrogen) supplemented with 2 mmol/l glutamine, 25 µg/ml gentamicine, 100 nmol/l dexamethasone, 0.1% fatty acid-free BSA, 2% (v/v) Ultrosor G (Invitrogen) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, 95% air. After cell attachment (6 h), medium was changed fresh Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 2 mmol/l glutamine, 25 µg/ml gentamicine, 100 nmol/l dexamethasone, and 5 mmol/l d-glucose, and cells were treated either with fenofibrate (FF) (100 µmol/L) or DMSO for 24 h and IL-1 (10 ng/mL) for 3 hours.

Transfection assays

HepG2 cells were grown in MEM containing 10% foetal calf serum (FCS) (Invitrogen Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), 2mM glutamine, 25µg/mL gentamycine, 1mM sodium pyruvate, and non-essential amino acids (Invitrogen) in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. For reporter assays, HepG2 cells were transiently transfected with the p1168hu.IL6P-luc⁺ corresponding to the wild-type human IL-6 promoter construct coupled to the *firefly* luciferase and the empty vector (e.v.) or the PPARα expression vector using ExGen 500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France) according to the manufacturer's protocol. The total amount of DNA was equalized to 0.5 µg by adding pBSSK⁺ vector. After a 5 h incubation period, cells were treated, in MEM 0.2% FCS, with IL-1 (10 ng/mL). Cells extracts were prepared using Reporter Lysis Buffer (Promega, Charbonnières, France), and luciferase and β-Galactosidase activities were measured as previously described (26). Statistical analysis was performed using Student's *t* test, **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001.

Hydroporation method

Animal studies were performed on 10 weeks old PPARα-null female mice on a C57Bl6/J genetic background. For injection, mice were anaesthetized by intraperitoneal injection with a solution of domitor (0.68 mpk) / ketamin (67 mpk) (Orion Pharma, Espoo, Finland/Virbac, Carros, France). Rapid tail vein injection (hydroporation) was performed as previously described (27-32). Briefly, injections were performed in the morning using 20 µg of the control empty vector or PPARα expression vector in saline 9% (w/v) solution in a total volume of 1.6 mL per mouse (18-20 g). Mice were allowed to recover on cotton following subcutaneous injection of the antidote antisedan at 1.7 mpk (Orion Pharma). Fenofibrate (FF) treatment was performed by gavage (200 mpk). Mice received the first gavage 8 hours post-hydroporation and the second one 24 hours post-hydroporation and were subjected to peritoneal injection of either murine IL-1 or murine IL-6 or LPS 1 hour later. After a total 3h period, mice were anaesthetized and then sacrificed. Each group was composed of 5 mice. Expression of hydroporated PPARα was analyzed in several tissues including liver, heart, aorta, skeletal muscle, adipose tissue, kidney and spleen. PPARα expression was exclusively detected in the liver.

Plasma cytokine concentrations

Plasma levels of TNF, IL1 or IL6 were determined by ELISA (R&D systems Europe) following manufacturer's instructions. Statistical analysis was performed using Student's *t* test, **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001.

Reagents

Fenofibric acid (Laboratories Fournier Dijon, France) was dissolved in DMSO (Me₂SO). Fenofibrate suspended in 1% carboxymethylcellulose (CMC, low viscosity, Sigma) was administered by gavage at

a dose of 200 mpk. Control animals received equivalent volumes (100 μ l) of 1% CMC in similar conditions. Murine recombinant IL-1 or IL-6 (0.5 μ g per mouse) (Tebu Le Perray-en-Yvelines, France) and LPS (*Escherichia coli*, serotype 055:B5, Sigma) prepared in saline 9 g/L were administered by peritoneal injection at the dose of 50 μ g per mouse.

Results

PPAR α activation prevents IL-1-mediated APR gene expression *in vivo*

To study the effect of PPAR α activation on IL-1-mediated APR gene expression *in vivo*, we examined mRNA levels of APR genes in liver such as serum amyloid A (SAA) and haptoglobin (HG) in mice untreated (Cont) or treated with fenofibrate (FF), and subsequently stimulated or not by IL-1 (Figure 1). The APR genes were analyzed together with the well-characterized PPAR α target gene Acyl-CoA oxidase (ACO). As expected, ACO mRNA levels were increased in fibrate-treated mice (data not shown). Moreover, mice stimulated with IL-1 responded with a strong induction of the mRNA expression of SAA (Figure 1A) and a lower but obvious increase of HG mRNA expression (Figure 1B). Interestingly, this IL-1 effect was strongly impaired by fenofibrate treatment. Next, we analyzed the effect of fibrate-activated PPAR α on APR gene transcription *in vivo* by performing nuclear run-on transcription assays on nuclei prepared from livers of mice untreated or treated with fenofibrate and stimulated or not by IL-1 (Figure 2). Mice treated with fenofibrate showed an increase transcription rate of ACO. Remarkably, mice stimulated with IL-1 exhibited an increased transcription rate for SAA and HG genes, which was strongly attenuated once PPAR α was activated by its agonist. Together these results demonstrate that PPAR α controls the APR gene expression stimulated by IL-1 at a transcriptional level *in vivo*.

PPAR α controls IL-1-induced APR gene expression through a direct action within the hepatocyte

We next investigated whether the negative interference of fenofibrate-activated PPAR α on IL-1-induced APR gene expression occurs within the hepatocyte. To that end, we analyzed cellular mRNA level of APR gene in primary mice hepatocytes isolated from mouse liver (Figure 3). Primary hepatocytes treated with fenofibrate exhibited an enhanced expression of ACO gene (data not shown). IL-1 treatment of primary cells increased mRNA levels of APR genes. Fenofibrate treatment attenuated the IL-1-mediated induction of both SAA and HG gene expression (Figure 3A and B). These findings indicate that PPAR α activation prevents IL-1-induced APR gene expression both *in vivo* and *in vitro* and that this effect is due to a direct activity of PPAR α within the hepatocyte.

PPAR α activation prevents IL-1-induced secondary wave IL-6 cytokine both *in vitro* and *in vivo*

Previously, it has been shown that the pro-inflammatory cytokine IL-6 is an inducer of APR gene expression (3-5). Moreover, it is known that IL-6 is a target gene of IL-1 (33, 34). Thus IL-6 can be

considered as an acute phase protein of both a primary and as a secondary wave cytokine. Therefore, to determine whether IL-1-mediated IL-6 induction is prevented by hepatic PPAR α activation, primary hepatocytes isolated from mice were treated by the PPAR α agonist or IL-1 or combination of both (Figure 4 A). Primary cells treated with fenofibrate showed an increased of ACO gene expression (data not shown). Interestingly, IL-1-induced IL-6 mRNA expression was fully prevented by fenofibrate-activated PPAR α . To check whether treatment with fenofibrate has a similar effect *in vivo*, we analyzed IL-6 mRNA expression in liver of mice that were treated by fenofibrate and subsequently stimulated by IL-1. As expected, ACO expression levels were increased in fibrate-treated mice (data not shown). Importantly, the pronounced increase of IL-6 mRNA level due to IL-1 stimulation was fully impaired by PPAR α activation (Figure 4B). Next, to confirm that the effect of PPAR α on IL-1-induced IL-6 gene expression occurs at a transcriptional level, human hepatoma HepG2 cells were transfected with the human IL-6 promoter construct and PPAR α expression vector. Cells were subsequently stimulated with or without IL-1. As presented in Figure 4C, IL-1 treatment increased activation of the IL-6 promoter, an effect prevented by PPAR α . Together, these results indicate that PPAR α activation prevents both *in vitro* and *in vivo* IL-1-induced mRNA expression of hepatic IL-6. This effect may further contribute to the observed reduction in IL-1-induced hepatic APR gene expression under fibrate treatment, and would allow preventing exacerbation and propagation of the inflammation by blocking secondary wave cytokine expression.

Effect of fenofibrate occurs via a liver-specific activation of PPAR α

Next, we sought to determine whether the inhibitory effect of fenofibrate requires liver-specific activation of PPAR α . To that end, PPAR α was subjected to transient *in vivo* transfection in mice using hydroporation methodology (27-32). PPAR α was expressed exclusively in the liver of PPAR α deficient mice and was not detected in the other tissues tested (heart, aorta, skeletal muscle, adipose tissue, kidney and spleen). The animals were orally treated by fenofibrate and acute phase genes expression was induced by peritoneal injection of either IL-1 or IL-6. We thus examined hepatic expression of IL-6, fibrinogen- α and SAA genes as representative genes of the acute phase response (Figure 5). The expected induction of SAA and IL-6 genes expression by IL-1 was not prevented by fenofibrate treatment in PPAR α deficient mice. By contrast, liver-expressed PPAR α restored the inhibitory effect of the PPAR α agonist fenofibrate on the IL-1-mediated acute phase response (Figure 5A and B). Similar results were observed when mice were treated with IL-6 (Figure 5C and D). Indeed, treatment of PPAR α deficient mice by IL-6 resulted in a strong induction of SAA and fibrinogen genes expression that was not affected by fenofibrate treatment. Interestingly, this stimulation was strongly attenuated by fenofibrate in mice displaying liver-restricted expression of PPAR α . Thus these data provide clear evidence that PPAR α is required for the effects of fenofibrate and confirming that liver-restricted PPAR α activated by fenofibrate is capable, *in vivo*, for blocking both IL-6 and IL1-mediated induction of APR related genes in the liver.

Infection-induced APR gene expression is impaired by fenofibrate-activated PPAR α *in vivo*

In vivo stimulation of the APR by IL-1 or IL-6 constitutes an individual inflammatory response. By contrast, Lipopolysaccharides (LPS), which are biological components of the outer membrane of gram-negative bacteria, are important inducers of inflammation signaling pathways and are widely used model to mimic infection/inflammation *in vivo*. To determine whether the global suppressive action of PPAR α applies to the broader context of inflammation/infection-induced APR gene expression, we treated PPAR α deficient mice displaying liver-restricted PPAR α expression with LPS (Figure 5). LPS treatment of PPAR α deficient mice led to the stimulation of SAA and fibrinogen- α gene expression (Figure 5E and F). Again, as observed for the APR induced by individual cytokines, the LPS effects were significantly prevented in mice expressing specifically PPAR α in liver and activated by fenofibrate. These results corroborate our findings in the context of individual cytokines, and demonstrate that PPAR α has a negative action on the broader spectrum of action of pro-inflammatory mediators produced by the liver during infection.

Effect of liver-specific PPAR α on systemic inflammation

LPS triggers signal transduction pathways to release various cellular mediators, including the pro-inflammatory cytokines TNF, IL-1 and IL-6 (6, 7). Thus, we tested the ability of hepatic PPAR α to influence circulating cytokine levels in mice by measuring TNF, IL1 and IL6 concentrations after LPS-induced acute inflammation (Figure 7). As previously, liver-restricted PPAR α expressing mice were treated with fenofibrate and LPS or not. As expected, LPS treatment of PPAR α deficient mice resulted in a strong elevation of TNF, IL-1 and IL-6 plasma concentrations (Figure 7A, B and C). This effect was not prevented by fenofibrate treatment in PPAR α -deficient mice. Interestingly, the enhancement of these circulating pro-inflammatory cytokines concentrations was drastically prevented in liver-restricted PPAR α expressing mice treated with fenofibrate (Figure 6A, B and C). Furthermore, the lowering of circulating levels of TNF, IL-1 and IL-6 was correlated with the decrease of their respective liver mRNA levels, (Figure 6D, E and F respectively). Taken together, these results strongly demonstrate that liver-specific PPAR α activation lowers concentrations of circulating level of pro-inflammatory cytokines. These results suggest that through a liver action, PPAR α may modulate the propagation of inflammation that may have important consequences in cells targeted by pro-inflammatory cytokines.

Repercussion of liver-specific PPAR α at the vascular wall level

To assess the anti-inflammatory potential of liver-specific PPAR α activation, we analyzed the expression genes encoding vascular adhesion molecules in aorta (35). To that end, we measured the expression of ICAM-1 and VCAM-1 in aortas of hydroperated mice stimulated by LPS (Figure 6G

and H). The expression of both ICAM-1 and VCAM-1 was markedly induced by LPS injection in PPAR α -deficient mice. Interestingly, the expression of the pro-inflammatory genes ICAM-1 and VCAM-1 was significantly reduced in aorta of liver-specific PPAR α expressing mice. Altogether, these results demonstrate that PPAR α lowers systemic and aortic inflammatory response through a specific action at the liver level.

Discussion

Modulation of the acute phase response by PPAR α has been studied in human cells (16, 19). We also reported that PPAR α behaves as a modulator of the acute phase response mediated by IL-6 *in vivo* (18, 36). In the present work, we investigated the potential overall action of PPAR α on the acute phase response *in vivo*. First, we demonstrated that PPAR α prevents IL-1-induced transcription of the acute phase response gene expression *in vivo*. Moreover, we also found that the activation of PPAR α prevents IL-1-stimulated IL-6 expression that may be considered as an APR gene, in liver. Furthermore, we demonstrated that PPAR α reduces the stimulation of the APR mediated by LPS that was used to mimic infection. Importantly, we also demonstrate that PPAR α controls liver expression of pro-inflammatory mediators TNF, IL-1 and IL-6. Finally, we demonstrate the attenuation of circulating levels of cytokines through a liver-restricted action of PPAR α . Our data suggest that PPAR α may control circulating risk factors of atherosclerosis through a distal mechanism operating in liver.

The suppression of the IL-1 response in liver is in line with our previous observations demonstrating that PPAR α controls the APR stimulated by IL-6 (18) and underscores the broad inhibition of APR gene expression by PPAR α activation. Acute phase response is initiated by the release of soluble mediators mainly cytokines secreted by monocytes, among which TNF/IL-1 family of cytokines that belong to the primary wave of pro-inflammatory cytokines and are able to stimulate a second wave of cytokines such as IL-6. TNF and IL-1 are main directors of the inflammatory process and induce a large panel of cytokines and other mediators acting in signaling cascade on target cells as well as within autocrine loop (1, 37),(38). Taking into account that IL-1 up-regulates IL-6 expression, action of PPAR α on this link constitutes a complimentary mechanism aimed at controlling pro-inflammatory cytokine signaling. This hypothesis was demonstrated in cells involved in the pathology of atherosclerosis. For instance, ligand activation of PPAR α prevents IL-1-induced expression of IL-6 in smooth muscle cells (20). Here, we found that in addition to the inhibition of IL-1 stimulated APR, PPAR α prevents the IL-1-mediated induction of hepatic IL-6 expression *in vivo*. Our findings indicate a potential role of PPAR α agonists in the regulation of inflammatory cytokine signaling in liver. The inhibition of the IL-1-stimulated expression of multiple acute phase response genes by PPAR α agonists in association with the reported interference between PPAR α and AP-1 and NF- κ B signaling strongly argue in favor of an important role of PPAR α in the control of inflammation at the hepatic and the vascular wall level. Therefore, PPAR α modulates hepatic inflammatory risk markers of

cardiovascular diseases directly via repression of APR protein expression and reduction of secondary wave of pro-inflammatory cytokines.

The well-characterized model of infection mimicked by endotoxin treatment such as LPS allowed us to investigate the action of PPAR α on broader spectrum of pro-inflammatory cytokines secreted by liver. In the present study, we found, in the broader context of inflammation stimulated by LPS, that PPAR α is capable for blocking APR genes expression as well as pro-inflammatory cytokine expression in liver. Of note, LPS is known to down-regulate the expression of several nuclear receptors in liver among which PPAR α and some of its well characterized target genes such as those of lipid metabolizing enzyme (39),(40). This may explain how APR induced by LPS is associated with metabolic disturbance. Although LPS could attenuate PPAR α activity, remaining expression levels of PPAR α in mice (expression decreased to 50% of basal levels) is still sufficient to attenuate deleterious effect of LPS.

Several mechanisms could be evoked to explain the broad control of acute phase response by PPAR α . Many studies have reported the involvement of PPAR α at different steps of the IL-1 signaling pathway to explain mechanism of inhibition. Indeed, it has been previously reported that soluble Interleukin-1 receptor antagonist (an inhibitor of cytokine signaling) is a direct target gene of PPAR α . By inhibiting binding of IL-1 to its receptor via increased expression of its natural antagonist, PPAR α might prevent or counteract the activation of the IL-1-signaling cascade (41). Furthermore, previous works from our group identified that PPAR α inhibits inflammatory gene expression, such as those of IL-6, at the transcriptional level upon physical interaction with c-Jun and p65 (15). Pro-inflammatory cytokines (TNF, IL-1) and endotoxin LPS all induce the NF- κ B-activating signaling. Whereas all these inducer signals act through different receptors, they all converge toward the activation of NF- κ B. We can therefore speculate that the interaction between PPAR α and NF- κ B might partially explain the inhibitory action of PPAR α on LPS-induced APR. In a previous work, we studied PPAR α modulation of IL-6-mediated APR (18). IL-6 actions are mediated by a specific cell surface IL-6 receptor (IL-6R), glycoprotein gp80 and a signal-transducing molecule, glycoprotein gp130. We found that a three days PPAR α activation results in the down-regulation of the IL-6 receptor components gp80 and gp130 in liver explaining the attenuation of the IL-6 response. In the present study, the shorter period of treatment revealed that complementary mechanisms might exist such as sequestration of cofactors (16) for IL-6-induced APR attenuation.

The definition of atherosclerosis as an inflammatory disease came from the intensive investigations showing the role of inflammation in atherogenesis at different steps of the lesion apparition and progression (1). TNF, IL-1 and IL-6, considered as early cytokines have pleiotropic activity and act both locally and distally (6). Interestingly, the hydroporation method allowed here to analyze the specific liver-restricted action of PPAR α . Importantly we here demonstrated that PPAR α , once activated by its ligand, might prevent the exacerbation and propagation of inflammation by

decreasing the concentration of the pro-inflammatory mediators TNF, IL-1 and IL-6 from liver to blood. An important finding of our study is the observed impact of the lowering of plasma concentrations of the latter cytokines at the vascular wall level. Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease in which early atherogenic events include increased expression of vascular adhesion molecules and chemoattractants followed by increased adhesion of monocytes and lymphocytes (42). In our model of liver-specific PPAR α expressing mice treated with LPS, the lowered circulating levels of pro-inflammatory cytokines were correlated with a decreased inflammatory signalling at the vascular wall level. Indeed, ICAM-1 and VCAM-1 expression in aorta was significantly lower in liver-specific PPAR α expressing mice. Increased ICAM-1 and VCAM-1 expression has been suggested to be associated with or predict atherosclerotic lesions (43, 44). Reduced expression of these adhesion molecules have been shown to protect against atherosclerosis in mice (45, 46). Therefore, our data indicate that PPAR α attenuates systemic and vascular inflammatory response via a liver-specific control of pro-inflammatory cytokine gene expression. This identifies a main role of PPAR α in liver in limiting the propagation of inflammation to the whole body. The acute phase can be prolonged and converted to chronic phase of inflammation. Although inflammatory processes are important for the initiation of defense mechanisms, they can become deleterious under situations of chronic activation. Thus, PPAR α activators appear an interesting therapeutic option for the attenuation of inflammatory processes associated to atherosclerosis beyond their effects on lipid levels. Our data suggest that activation of hepatic PPAR α could be sufficient to attenuate the circulation of inflammatory factors allowing protection or at least attenuation of cardiovascular diseases such as atherosclerosis.

In conclusion, this study demonstrates the implication of hepatic PPAR α in the control of inflammation and infection. Indeed, our results demonstrate that PPAR α controls primary and secondary wave of pro-inflammatory production at the hepatic level (Figure 8). Moreover, PPAR α control the acute phase response by blocking the synthesis of acute phase reactants. Together, these regulations demonstrate that PPAR α controls the exacerbation of inflammation at the hepatic level. Interestingly, the hepatic control of inflammation by PPAR α -activation leads to decrease circulating cytokine concentrations. Thus, PPAR α might prevent the propagation of inflammation, which suggests a beneficial impact of liver-restricted PPAR α activation at a distal level as for example the vascular wall. It could be of interest to engineer liver-specific pharmacological agonists. Further investigations are required to identify the physiological benefits of the distal response of PPAR α activation. Taking into account its properties at the vascular wall level, PPAR α can be considered as a factor playing a determinant role in the control of inflammation at the molecular level and as an attractive target to attenuate deleterious effect of inflammation on cardiovascular diseases.

References

1. **Tedgui A, Mallat Z** 2006 Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 86:515-81
2. **Ross R** 1999 Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138:S419-20
3. **Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V** 2000 Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148:209-14
4. **Hoffmeister A, Rothenbacher D, Bazner U, Frohlich M, Brenner H, Hombach V, Koenig W** 2001 Role of novel markers of inflammation in patients with stable coronary heart disease. *Am J Cardiol* 87:262-6
5. **Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C** 2001 Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med* 29:S42-7
6. **Baumann H, Gauldie J** 1994 The acute phase response. *Immunol Today* 15:74-80
7. **Hirano T** 1998 Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 16:249-84
8. **Issemann I, Green S** 1990 Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-50
9. **Issemann I, Prince RA, Tugwood JD, Green S** 1993 The retinoid X receptor enhances the function of the peroxisome proliferator activated receptor. *Biochimie* 75:251-6
10. **Shulman AI, Mangelsdorf DJ** 2005 Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med* 353:604-15
11. **Ijpenberg A, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B** 1997 Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* 272:20108-20117
12. **Gervois P, Chopin-Delannoy S, Fadel A, Dubois G, Kosykh V, Fruchart JC, Najib J, Laudet V, Staels B** 1999 Fibrates increase human REV-ERB α expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol Endocrinol* 13:400-9
13. **Gervois P, Fruchart JC, Staels B** 2007 Drug Insight: mechanisms of action and therapeutic applications for agonists of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3:145-56
14. **Gervois P, Torra IP, Fruchart JC, Staels B** 2000 Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin Chem Lab Med* 38:3-11
15. **Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B** 1999 Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 85:394-402
16. **Gervois P, Vu-Dac N, Kleemann R, Kockx M, Dubois G, Laine B, Kosykh V, Fruchart JC, Kooistra T, Staels B** 2001 Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem* 276:33471-7
17. **Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W** 1996 The PPAR α -leukotriene B $_4$ pathway to inflammation control. *Nature* 384:39-43

18. **Gervois P, Kleemann R, Pilon A, Percevault F, Koenig W, Staels B, Kooistra T** 2004 Global suppression of IL-6-induced acute phase response gene expression after chronic in vivo treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate. *J Biol Chem* 279:16154-60
19. **Kleemann R, Gervois PP, Verschuren L, Staels B, Princen HM, Kooistra T** 2003 Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation. *Blood* 101:545-51
20. **Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A** 1998 Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 393:790-3
21. **Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutzky J** 1999 PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 99:3125-31
22. **Vanden Berghe W, Vermeulen L, Delerive P, De Bosscher K, Staels B, Haegeman G** 2003 A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR. *Adv Exp Med Biol* 544:181-96
23. **Gorski K, Carneiro M, Schibler U** 1986 Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter. *Cell* 47:767-76
24. **Nevins JR** 1987 Isolation and analysis of nuclear RNA. *Methods Enzymol* 152:234-41
25. **Berry MN, Friend DS** 1969 High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43:506-20
26. **Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, Haegeman G** 1998 p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 273:3285-90
27. **Hagstrom JE** 2003 Plasmid-based gene delivery to target tissues in vivo: the intravascular approach. *Curr Opin Mol Ther* 5:338-44
28. **Zhang G, Gao X, Song YK, Vollmer R, Stolz DB, Gasiorowski JZ, Dean DA, Liu D** 2004 Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther* 11:675-82
29. **Al-Dosari MS, Knapp JE, Liu D** 2005 Hydrodynamic delivery. *Adv Genet* 54:65-82
30. **Andre FM, Cournil-Henrionnet C, Vernerey D, Opolon P, Mir LM** 2006 Variability of naked DNA expression after direct local injection: the influence of the injection speed. *Gene Ther* 13:1619-27
31. **Zhang X, Dong X, Sawyer GJ, Collins L, Fabre JW** 2004 Regional hydrodynamic gene delivery to the rat liver with physiological volumes of DNA solution. *J Gene Med* 6:693-703
32. **Liu F, Song Y, Liu D** 1999 Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 6:1258-66
33. **Munoz C, Pascual-Salcedo D, Castellanos MC, Alfranca A, Aragonés J, Vara A, Redondo JM, de Landazuri MO** 1996 Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits the production of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human endothelial cells in response to inflammatory mediators: modulation of NF-kappa B and AP-1 transcription factors activity. *Blood* 88:3482-90
34. **Akira S, Taga T, Kishimoto T** 1993 Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 54:1-78
35. **Galkina E, Ley K** 2007 Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2292-301

36. **Zambon A, Gervois P, Pauletto P, Fruchart JC, Staels B** 2006 Modulation of hepatic inflammatory risk markers of cardiovascular diseases by PPAR-alpha activators: clinical and experimental evidence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:977-86
37. **DeForge LE, Kenney JS, Jones ML, Warren JS, Remick DG** 1992 Biphasic production of IL-8 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human whole blood. Separation of LPS- and cytokine-stimulated components using anti-tumor necrosis factor and anti-IL-1 antibodies. *J Immunol* 148:2133-41
38. **Wanidworanun C, Strober W** 1993 Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *J Immunol* 151:6853-61
39. **Fang C, Yoon S, Tindberg N, Jarvelainen HA, Lindros KO, Ingelman-Sundberg M** 2004 Hepatic expression of multiple acute phase proteins and down-regulation of nuclear receptors after acute endotoxin exposure. *Biochem Pharmacol* 67:1389-97
40. **Feingold K, Kim MS, Shigenaga J, Moser A, Grunfeld C** 2004 Altered expression of nuclear hormone receptors and coactivators in mouse heart during the acute-phase response. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E201-7
41. **Stienstra R, Mandard S, Tan NS, Wahli W, Trautwein C, Richardson TA, Lichtenauer-Kaligis E, Kersten S, Muller M** 2007 The Interleukin-1 receptor antagonist is a direct target gene of PPARalpha in liver. *J Hepatol* 46:869-77
42. **Libby P** 2002 Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-74
43. **Zibara K, Chignier E, Covacho C, Poston R, Canard G, Hardy P, McGregor J** 2000 Modulation of expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in aortic arch lesions of apolipoprotein E-deficient compared with wild-type mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2288-96
44. **Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R** 1998 Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:842-51
45. **Dansky HM, Barlow CB, Lominska C, Sikes JL, Kao C, Weinsaft J, Cybulsky MI, Smith JD** 2001 Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1662-7
46. **Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, Lin AH, Melchior EP, Bullard DC, Beaudet AL** 1997 Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1517-20

Figure legends:

Figure 1. Fenofibrate attenuates APR gene expression induced by IL-1.

Mice were treated with 0.2% (w/w) fenofibrate (FF) or not (Cont) for two weeks and subsequently stimulated or not for 3 hours with IL-1 as indicated (4 mice per group). Total RNA extracted from liver was analyzed by quantitative RT-PCR to measure (A) SAA; Serum Amyloid A and (B) HG; Haptoglobin mRNA expression levels. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Figure 2. Effect of fenofibrate treatment on IL-1-induced transcription of acute phase response genes.

Mice were treated with 0.2% (w/w) fenofibrate (FF) or not (Cont) for two weeks and stimulated or not for 3 hours with IL-1 as indicated. Nuclear run-on assays were performed on nuclei isolated from liver. The autoradiogram shows glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a control, membrane background (Blank), ACO; Acyl CoA Oxidase, SAA; Serum Amyloid A and HG; Haptoglobin mRNA expression levels.

Figure 3. Fenofibrate attenuates APR gene expression induced by IL-1 through a direct effect within the hepatocyte.

Primary hepatocytes were isolated from mice liver and were *in vitro* treated with fenofibrate (100 μ M) (FF) or vehicle (0.1% Me₂SO) (Cont) for 24 hours and stimulated with IL-1 (10 ng/ml) for a further 6 hours period. Total RNA were extracted and subjected to quantitative RT-PCR analysis to measure (A) SAA; Serum Amyloid A and (B) HG; Haptoglobin mRNA expression levels. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Figure 4. Fenofibrate prevents IL-1-mediated hepatic IL-6 expression *in vitro* and *in vivo*.

(A) Mice were treated with 0.2% (w/w) fenofibrate (FF) or not (Cont) for two weeks and stimulated or not for 3 hours with IL-1 as indicated (4 mice per group). Total RNA extracted from liver was analyzed by quantitative RT-PCR to measure IL-6 mRNA expression levels. (B) Primary hepatocytes were isolated from liver and were subsequently treated *in vitro* with fenofibrate (100 μ M) or vehicle (0.1% Me₂SO) for 24 hours and stimulated with IL-1 (10 ng/ml) for a further 6 hours period. Total RNA were extracted and subjected to quantitative RT-PCR analysis to measure IL-6 mRNA expression levels. (C) HepG2 cells were transiently transfected with the control empty vector (e.v.) or PPAR α expressing vector and the IL-6-promoter driven reporter gene (p1168hu.IL6P-luc+ containing AP-1 and NF- κ B response elements) and treated or not by human IL-1 (10 ng/mL) for 4 hours or vehicle (water). 24 hours after transfection, cells were harvested and luciferase and β -Galactosidase activities were measured. Results are presented as relative light units / β -Galactosidase activities. Results are expressed as means \pm SDs. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$

Figure 5. Liver-restricted activation of PPAR α mediates fenofibrate attenuation of IL-1, IL-6, and LPS stimulation of the acute phase response.

PPAR α expression was restored in PPAR α deficient mice by rapid tail vein injection (hydroporation) as described in Materials and Methods. Mice received empty vector (e.v.) or PPAR α expression vector (PPAR α). Mice were treated with 200 mpk fenofibrate (FF) and were subsequently stimulated for 3 hours with IL-1 (0.5 μ g/mouse) (A) and (B), or IL-6 (0.5 μ g/mouse) (C) and (D) or LPS (50 μ g/mouse) (E) and (F) as indicated. Total RNA was extracted from liver. SAA; Serum Amyloid A, IL6 and Fibrinogen mRNA expression levels were measured by quantitative RT-PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Figure 6. Liver-restricted PPAR α activation lowers pro-inflammatory cytokines plasma levels.

PPAR α expression was restored in PPAR α deficient mice by rapid tail vein injection as described in Materials and Methods. Control mice received empty vector (e.v.) or PPAR α expression vector (PPAR α). Mice were treated with 200 mpk fenofibrate (FF) and subsequently stimulated for 3 hours with LPS (50 μ g/mouse). Plasma levels of (A) TNF, (B) IL-1 and (C) IL-6 were determined by ELISA. Real time PCR analysis of liver (D), (E) and (F) or aorta (G) and (H) gene expression for indicated genes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$

Figure 7. Scheme illustrating the different level of control of the acute phase response by PPAR α .

Activation of PPAR α controls the elevation of circulating TNF/IL-1 or IL-6 cytokines stimulated by endotoxin. PPAR α may modulate both TNF/IL-1 and IL-6 signaling through a direct action on the pathway or via the down-regulation of IL-1-mediated stimulation of IL-6 expression. The overall action of PPAR α on the acute phase response triggered by infection or inflammation leads to the limitation of atherosclerosis risk factor of hepatic origin.

Triangle, PPAR α ligands ; grey square, TNF/IL-1 ; white square, IL-6.

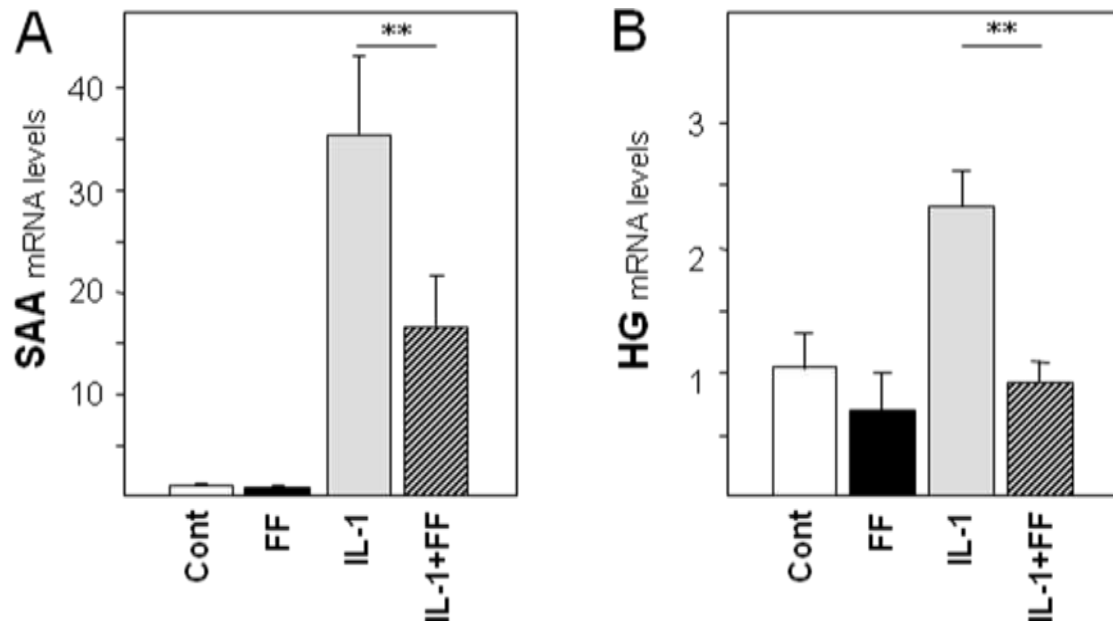


Figure 1

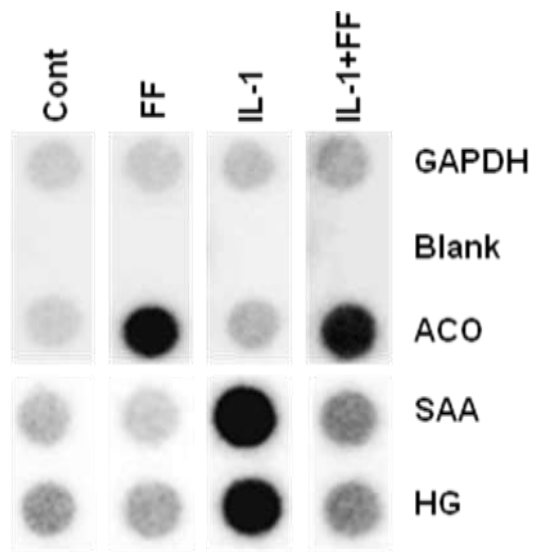


Figure 2

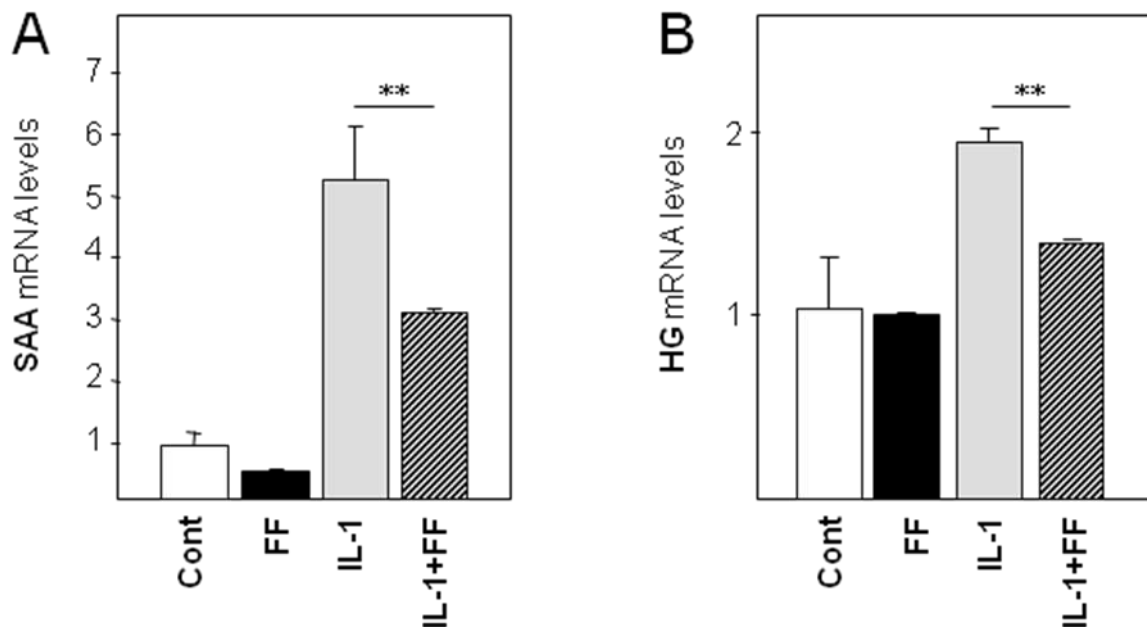


Figure 3

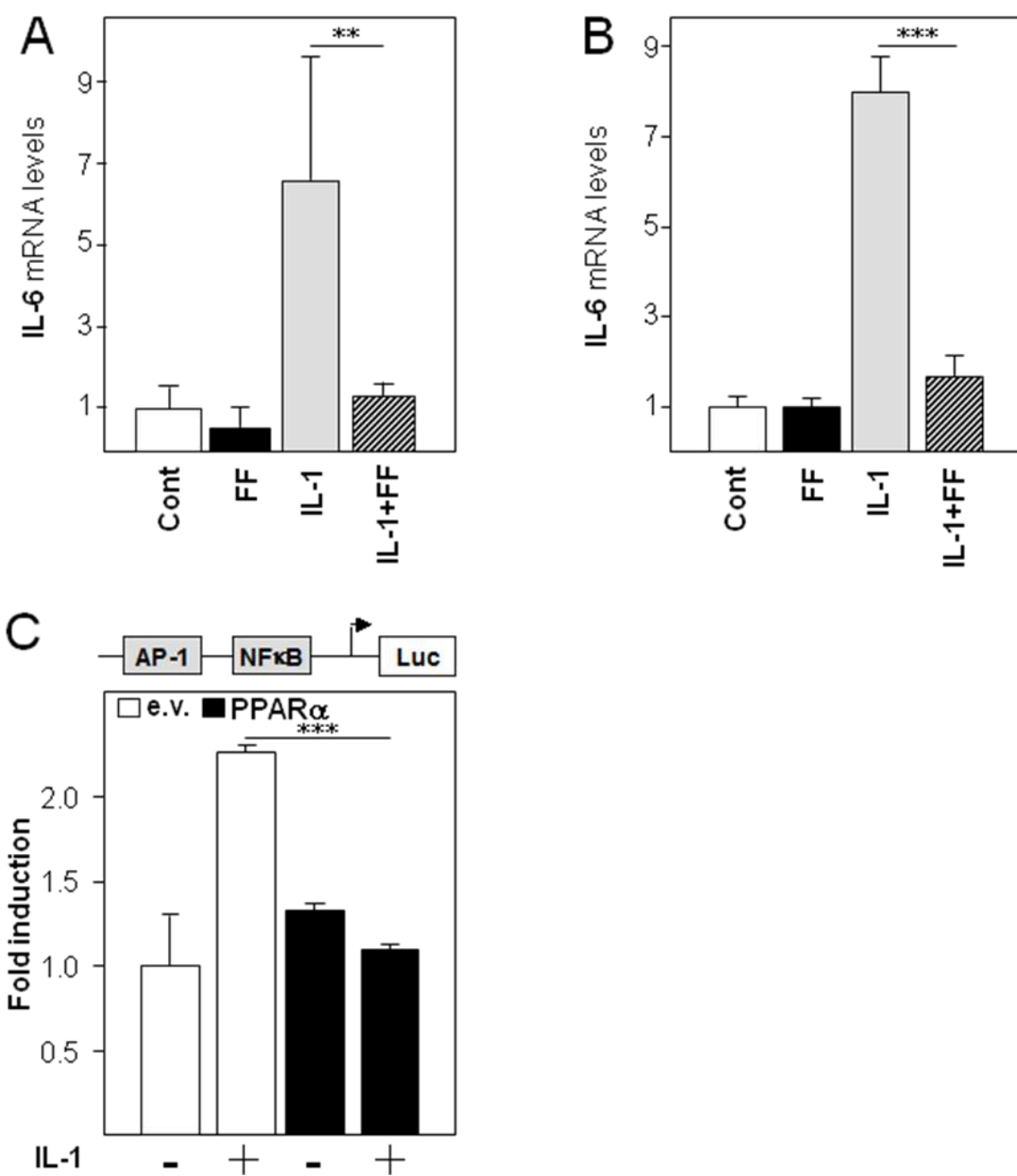


Figure 4

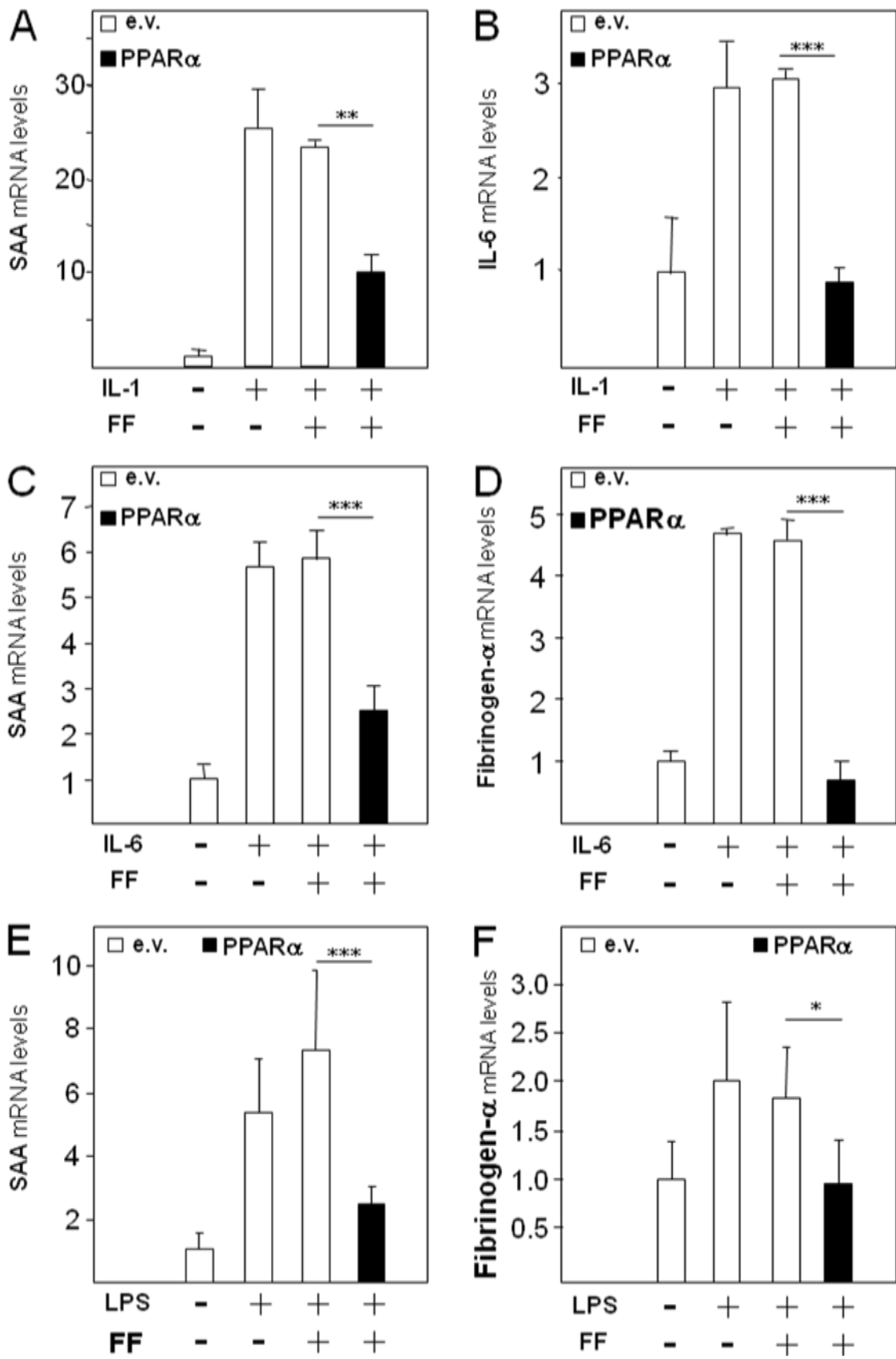


Figure 5

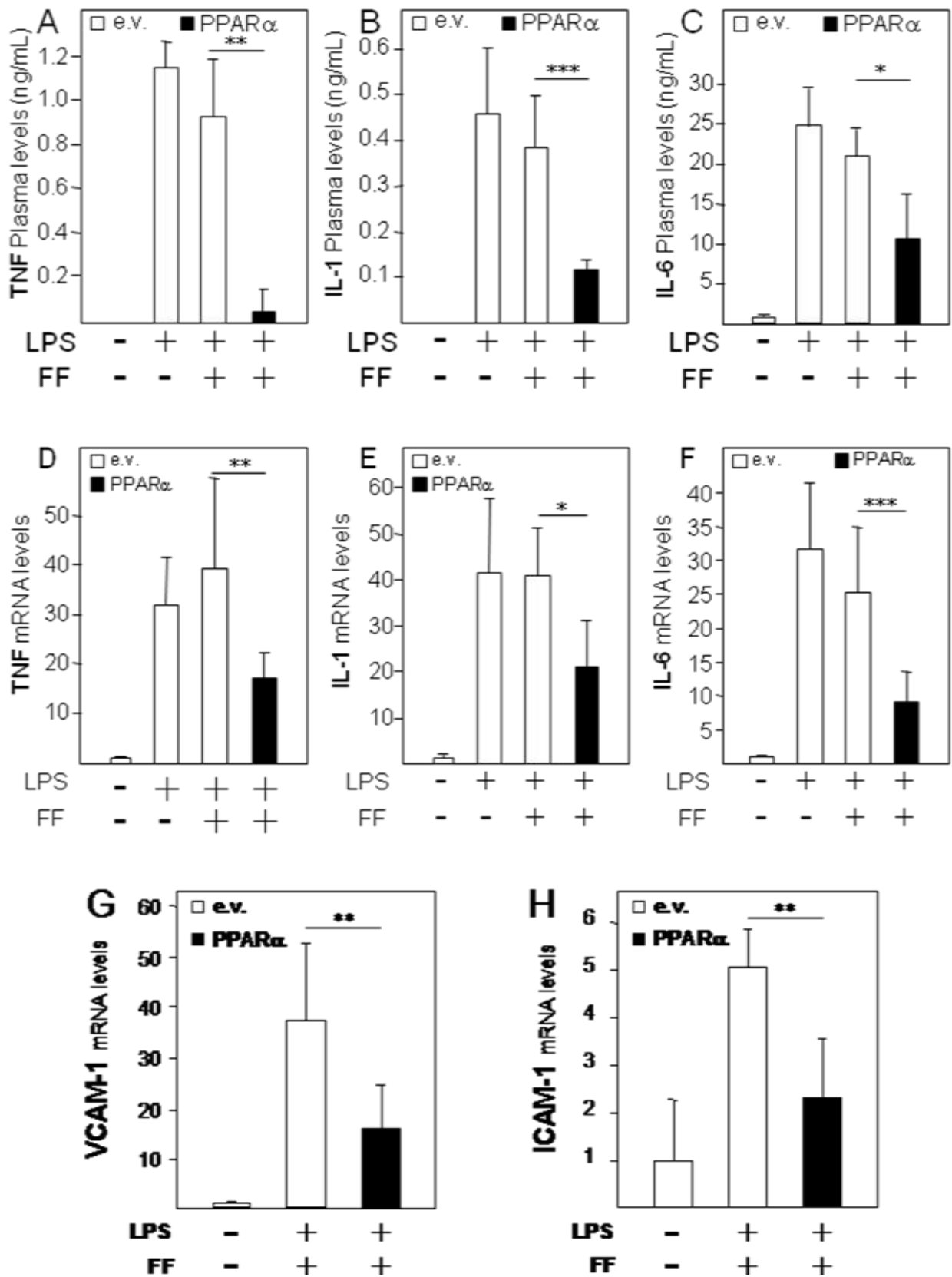


Figure 6

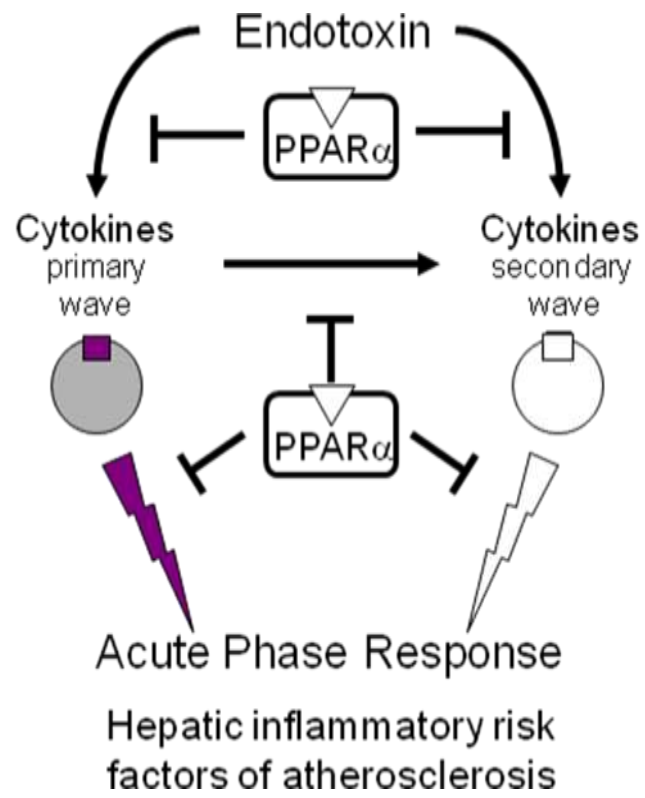


Figure 7

IV-2- Seconde étude :

IV-2-1- Contexte

Les dyslipidémies et l'inflammation sont deux facteurs de risque majeurs de maladies cardio-vasculaires. Or, de nombreux travaux ont permis de démontrer un nouveau rôle des PPAR dans le contrôle et la modération des processus inflammatoires, qui, en situation chronique, favorisent le développement de l'athérosclérose. Par conséquent, les PPAR sont devenus des cibles thérapeutiques de grand intérêt par leur action générale dans la limitation des facteurs. PPAR α peut se fixer à l'ADN et, par ce mécanisme, activer l'expression des gènes liés au métabolisme des lipides et des lipoprotéines (effet normolipémiant par cisactivation). Les mécanismes de répression des gènes par PPAR α s'opèrent de façon indépendante de la fixation à l'ADN et concernent essentiellement les gènes de l'inflammation (effet anti-inflammatoire par transrépression).

Ainsi, le traitement par des activateurs pharmacologiques de PPAR α , les fibrates, sont la conséquence de la somme des effets normolipémiants et des effets anti-inflammatoires. Néanmoins, la contribution relative de l'effet normolipémiant de PPAR α d'une part, et de son activité anti-inflammatoire d'autre part, indépendamment l'un de l'autre, dans le traitement de l'athérosclérose, sont difficiles à évaluer.

IV-2-2- Objectifs

Mettre au point un système dans lequel PPAR α présente des fonctions dissociées, c'est-à-dire conservent une fonction anti-inflammatoire mais est dénué de fonction normolipémiante hors du contexte inflammatoire et permettent ainsi l'étude de ses deux fonctions indépendamment l'une de l'autre.

IV-2-3- Stratégie

Par une approche de génie génétique, des mutations de PPAR α ont été introduites de façon à obtenir une série de mutants de PPAR α dont certains sont incapables d'activer la transcription des gènes mais conservent leur capacité à réprimer l'expression des gènes.

IV-2-4- Conclusion

Nous avons obtenu une protéine PPAR α présentant des fonctions dissociées. Celui-ci nous a permis d'étudier le rôle de PPAR α dans le contrôle de l'inflammation indépendamment de sa fixation à l'ADN et donc de son action directe sur les gènes impliqués dans le catabolisme des lipides.

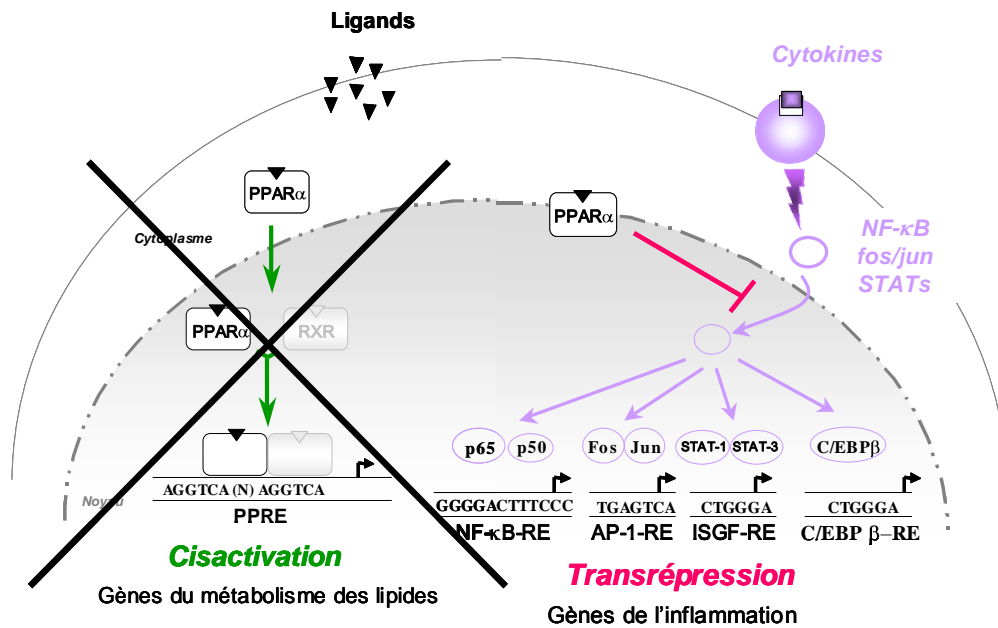


Figure 9 : Etude des propriétés anti-inflammatoires de PPAR α indépendamment de ces propriétés de transactivation

Seconde étude : soumise pour publication

PPAR α controls hepatic inflammation response and systemic propagation in a DNA binding-independent manner

Roxane M. Mansouri^{1,2,3}, and Philippe Gervois^{1,2,3}

¹ Institut Pasteur de Lille, Lille, F-59019 France

² Inserm, U1011, Lille, F59019 France

³ EA4481 GRIIOT, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Lille 2, Lille, F-59006 France

Corresponding author. Philippe GERVOIS, Laboratoire de biochimie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 3, rue du professeur Laguesse, BP83 F-59006, Lille, France

(philippe.gervois@univ-lille2.fr). Tel. 33 (0)3 20 96 43 62. Fax. 33 (0)3 20 96 49 11

Running title: Dissociation of PPAR α activities

Keywords: Gene regulation, Inflammation, Cytokines, Nuclear receptors, PPAR

Abbreviations: PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor alpha; DBD, DNA-binding domain; RXR, retinoid X receptor; PPRE, peroxisome proliferator response element; APR, acute phase response; IL-1, interleukin-1; IL-6, interleukin-6; LPS, lipopolysaccharide endotoxin

Abstract

The nuclear receptor PPAR α is a pharmacological target improving cardiovascular risk factors such as dyslipidemia and inflammation. PPAR α normolipemic actions involve activation of lipid metabolism-related genes *via* a DNA binding-dependent mechanism termed “transactivation”. Furthermore, PPAR α represses inflammatory genes via a protein/protein interactions mechanism termed "transrepression". The goal of this study was to determine whether PPAR α may control inflammation signalling in a DNA binding-independent manner. Our strategy was based on the introduction of mutation in the DNA binding domain of PPAR α in order to abolish transactivation. Ligand activation of PPAR α mutant (PPAR α_{dis}) was investigated *in vitro* and *in vivo* under basal and inflammatory conditions. Gel retardation assays confirmed that PPAR α mutant does not bind DNA. Transfection experiments demonstrated that PPAR α_{dis} lacks transactivation function but still attenuates cytokine-stimulated transcription of inflammatory genes *in vitro*. Furthermore, expression of PPAR α_{dis} in PPAR α -deficient mice treated with PPAR α agonists renders mice less responsive to the acute phase response mediated by inflammatory cytokines IL-1 or IL-6. In addition, we demonstrated that PPAR α restricted to transrepressor behavior exerts a general control of the acute phase response by using an inflammation/infection model. In such a context, liver-specific PPAR α_{dis} expressing mice displayed lower plasma levels of TNF, IL-1 and IL-6 cytokines and a distal lowering of adhesion molecule expression in aorta. Altogether, we demonstrated *in vivo* that PPAR α controls hepatic inflammation response, circulating levels of proinflammatory cytokines and subsequent vascular response in a DNA binding-independent manner.

Introduction

The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha (PPAR α) belongs to the super-family of nuclear receptors that function as ligand-dependent transcription factors (1). As most of a nuclear receptors, PPAR α contains three typical functional domains: a N-terminal domain, a central DNA-binding domain (DBD) and a C-terminal ligand-binding domain. Ligand activation of PPAR α leads to both activation and repression of target genes. Gene transcription activation by PPAR α , also termed "transactivation", requires an interaction of PPAR α and of its obligate heterodimeric partner RXR (Retinoid X Receptor) (2,3), with specific DNA sequences, so called peroxisome proliferator response elements (PPREs). Such elements are located in regulatory regions of target genes. This mechanism allows to the regulation of genes related to energy metabolism pathways and explain, for instance, the role of PPAR α in lipid homeostasis (4,5). Moreover, a second mode of action has been identified, where PPAR α modulates the activity of other transcription factors resulting in gene transcription repression commonly termed "transrepression". The molecular mechanism of transrepression is mainly based on physical interaction between PPAR α protein itself and other transcription factors such as NF κ B, AP-1, STATs and C/EBP, which are activated by pro-inflammatory stimuli (6,7). This mechanism is thought to be physiologically determinant to the control of inflammatory responses by PPAR α (6-12). Natural modulation of PPAR α activity is engaged by natural fatty acids and derivatives. Moreover, the hypolipidemic class of fibrates drugs, that are widely used in clinical practice for the treatment of dyslipidemia, are synthetic PPAR α ligands (3,5,13-18). Fibrates efficiently normalize hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia, both of which are established risk factors for cardiovascular diseases such as atherosclerosis. Atherosclerosis is a multifactorial and a multi-step disease that has been found associated with chronic inflammation. Indeed, the vascular lesions of atherosclerosis are not only the result of lipids accumulation but also of an endothelial dysfunction and of a vascular inflammation (19). Interestingly, it is now extensively reported that PPAR α behaves as a crucial regulator of metabolic and inflammatory components of cardiovascular diseases.

Produced as part of systemic inflammatory reactions, pro-inflammatory cytokines such as interleukin 6 (IL-6) and interleukin 1 (IL-1) induce the acute phase response (APR) which corresponds to the induction of acute phase proteins in liver, such as fibrinogen, serum amyloid A (SAA), α 2-macroglobuline and C-reactive protein (20-22). The APR typically induces changes in the concentration of specific plasma proteins, which help to protect the host

from further injury, and facilitates the repair process. However, inflammation is the hallmark of many diseases including atherosclerosis but also rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and other inflammatory rheumatic diseases. PPAR α , highly expressed in the liver, is known to be a modulator of the APR (8,23) (7,10,12) and represents a potential pharmacological target for inflammation-associated diseases (24).

It is not known whether PPAR α activation may counteract inflammatory cytokine signaling pathways in a DNA-binding independent manner. Mutation-based strategy was design in order to abolish transactivation without altering transrepression. Among several mutation tested, we found a PPAR α mutant (PPAR α_{R150Q}) that remains repressor of APR genes in response to IL-1, IL-6 and to lipopolysaccharide endotoxin (LPS) but that is unable to activate lipid metabolism related genes. Our results allowed us to demonstrate that despite an impaired capacity to activate transcription, PPAR α genes transrepression function remains intact *in vitro*. Since exhibiting dissociated function, this protein was therefore termed PPAR α_{dis} . Importantly we found *in vivo* that mice expressing PPAR α_{dis} remains highly efficient in controlling the acute phase response mediated by pro-inflammatory cytokines and endotoxin LPS used to mimic infection in mice. Finally, we found that liver-specific PPAR α_{dis} expression was necessary and sufficient to prevent endotoxin-stimulated elevation of pro-inflammatory cytokines plasma concentrations.

Results

PPAR α_{dis} has lost the ability to activate gene transcription

In order to study transrepression function of PPAR α independently of transactivation properties, we have created several PPAR α mutants harboring one amino-acid substitution within the second zinc finger of the DBD (amino-acid 101 to amino-acid 166) of PPAR α (Fig. 1A) expecting the abolishment of DNA binding capacities. Aspartate residue at position 140 was replaced by a cysteine and arginine at position 150 was changed to a glutamine residue, giving rise to mutants PPAR α_{D140C} and PPAR α_{R150Q} respectively. Protein expression was checked by western blot performed from human hepatoma HepG2 cells transfected with PPAR α wild type (PPAR α_{WT}) or mutant expression vector constructs. Relative expression levels of mutant and wild type receptors was similar (Fig. 1B) showing that mutations in the DBD of PPAR α did not affect its ability to be expressed and translated into a full-length protein *in vitro*.

We investigated DNA binding capacities of PPAR α_{D140C} and PPAR α_{R150Q} (Fig. 1C). The DR1 consensus sequence, and three natural PPREs from *ACO*, *CPT-1* and *HMG-CoA synthase* promoters (25,26) were co-incubated with *in vitro* synthesized RXR α and PPAR α_{WT} or mutant PPAR α_{R150Q} or PPAR α_{D140C} receptors (PPAR α_{R150Q} is termed PPAR α_{dis} from this section). For each PPRE tested, PPAR α_{WT} /RXR α and PPAR α_{D140C} /RXR α heterodimers were able to bind DNA whereas no signal could be detected for PPAR α_{dis} /RXR α heterodimer. As PPAR α_{D140C} is capable of binding to DNA, this mutant was not further analyzed.

Next, ligand-dependent transcriptional activities by PPAR α_{dis} were investigated in transient transfection assays using different PPRE driven promoter constructs. As expected, co-transfection of the PPAR α_{WT} expression vector resulted in the induction of heterologous promoter constructs driven by a DR1 or by a natural PPRE (*apoA2*), an effect enhanced by Wy14,643, a synthetic PPAR α ligand (Fig. 2A,B). Interestingly, PPAR α_{dis} displayed impaired basal and ligand-induced transactivation using either DR1 or *apoA2* PPRE driven heterologous promoter constructs. Similar results were obtained using reporter constructs driven by *CPT-1* or *ACO* promoters (Fig. 2C,D). To check whether the lack transactivation functions of PPAR α_{dis} are not linked to a diminished ligand binding affinity, PPAR α_{dis} expression vector was co-transfected in the presence of increasing amounts of Wy14,643 in the context of DR1 driven heterologous promoter construct (Fig. 3A). Compared to PPAR α_{WT} , PPAR α_{dis} receptor was unresponsive to Wy14,643 at any concentrations tested. Moreover, the loss of transactivation function of PPAR α_{dis} was independent of the ligand tested (Fig. 3B). Indeed, both fenofibric acid and the GW9578 compound failed to induce

PPAR α_{dis} mediated transactivation. To provide further evidence for the lack of transcriptional activation, the effect of PPAR α_{dis} on the activation of transcription of endogenous target genes was analyzed in HepG2 cells (Fig. 3C,D). Over-expression of PPAR α_{WT} resulted in an increased expression of PPAR α target genes such as those of *CPT-1* and *PDK4* in the presence of ligands. By contrast, over-expressed PPAR α_{dis} was ineffective in mediating the activation of endogenous target genes by PPAR α ligands. Altogether these results demonstrate that mutation of the DBD by substituting arginine at position 150 by glutamine abolishes the DNA binding-dependent transactivation function of PPAR α .

PPAR α_{dis} physically interacts with both p65 and c-Jun *in vitro*

Once demonstrated that the transactivation by PPAR α_{dis} was abolished, we went on to look at its transrepression function. PPAR α is well established as a negative regulator of the inflammatory response (23). Transrepression refers to the ability of PPAR α to decrease expression of target genes in the absence of an obvious PPRE (27). For instance, it has been previously described that PPAR α antagonizes NF κ B (p65 containing transcription factor complexes) and AP-1 (c-Jun containing transcription factor complexes) pathways through a direct binding to p65 and c-Jun giving rise to inactive complexes leading to an attenuation of inflammatory signaling pathways (6). To determine whether the PPAR α_{dis} remains able to interfere with NF κ B- and AP-1-dependent pathways, we evaluated its binding properties with p65 and c-Jun using GST-pull-down assays. As shown in figure 4A, PPAR α_{dis} remained capable of physical interaction with both transcription factors thus indicating that modification of DBD domain integrity by a point mutation at position 150 in the second zinc finger did not abrogate a major mechanism of transrepression mediated by PPAR α . These results demonstrated *in vitro* that PPAR α mechanism mediating repression of inflammatory genes might be separated from its ability to transactivate expression of genes involved in metabolism.

PPAR α_{dis} represses both IL-1 and IL-6 induced gene transcription and expression *in vitro*.

IL-1 and IL-6 are major stimulators of the APR in the liver through a direct action on hepatocytes, an effect attenuated by PPAR α (5,23). We investigated functional analysis of PPAR α_{dis} in the control of inflammatory signaling *in vitro* by transient transfection assays. First, a NF κ B driven reporter vector was used, either in the absence or the presence of p65-

NF κ B subunit in combination with PPAR α_{WT} or PPAR α_{dis} (Fig. 4B). The basal activation of NF κ B response element was significantly decreased by both PPAR α_{WT} and PPAR α_{dis} mutant receptors. As observed in the case of PPAR α_{WT} , co-transfection of PPAR α_{dis} was also able to repress p65-NF κ B subunit-mediated induction of NF κ B response element reporter gene (Fig. 4B). NF κ B and AP-1 response elements present in *IL-6* promoter stimulate *IL-6* gene transcription in response to inflammatory stimuli such as IL-1 (28,29). This regulation is counteracted following PPAR α activation (6) in vascular wall cells. This transrepressing action of PPAR α_{dis} was investigated in the context of the *IL-6* promoter in hepatocytes. IL-1-induced transcription of *IL-6* promoter-driven reporter gene was prevented by both PPAR α_{WT} and PPAR α_{dis} (Fig. 4C). To determine a broader transrepressive action of PPAR α_{dis} on inflammatory cytokines signaling, we studied its impact on IL-6-mediated transcription of human *fibrinogen- β* , an acute phase protein highly synthesized after IL-6 stimulation (Fig. 4D). We found that stimulation of fibrinogen promoter reporter construct by IL-6 was prevented by PPAR α_{WT} as well as by PPAR α_{dis} . These results show that PPAR α_{dis} interferes with IL-1 and IL-6 pathways at the transcriptional level. Next, we analyzed whether PPAR α_{dis} inhibits the induction of endogenous inflammatory gene expression in response to either IL-6 or IL-1 stimulation. Treatment of hepatocytes with IL-1 activates *SAA* and *IL-6* gene expression (Fig. 5A,B). Whereas co-incubation with PPAR α activators did not prevent the stimulation of *SAA* by IL-1, IL-1 activation of *IL-6* expression was abolished. However, over-expression of either PPAR α_{WT} or PPAR α_{dis} restored attenuation of IL-1-mediated stimulation of *SAA* gene expression by PPAR α activators and enhanced inhibition of *IL-6* gene expression. The transrepression properties of PPAR α_{dis} were also evaluated under IL-6 stimulatory conditions (Fig. 5C,D). IL-6 treatment resulted in induction of *SAA* gene expression and *fibrinogen- β* gene expression. This induction was inhibited in cells over-expressing either PPAR α_{WT} or PPAR α_{dis} , an effect enhanced by PPAR α agonists. Taken together, these data indicate that DBD mutation at position 150 does not alter the transrepression activity of PPAR α on endogenous inflammation-related genes *in vitro*. Importantly, PPAR α mediates attenuation of inflammatory signaling pathways by a transrepression mechanism that is dissociated from gene regulation by transactivation.

PPAR α_{dis} controls the acute phase response *in vivo*

Next, we sought to determine whether transactivation and transrepression properties of PPAR α may be dissociated *in vivo*. We previously reported that PPAR α controls APR *in vivo* (30-36). The potency of PPAR α_{dis} to behave as an active transrepressor in the living animal

was explored by evaluating its effect on the expression of APR genes stimulated by IL-1, IL-6 or LPS. PPAR α _{WT} or PPAR α _{dis} were expressed in mice using hydroporation methodology allowing expression of the receptors in the liver (30-36). To prevent an action from endogenous PPAR α , these experiments were performed using PPAR α -deficient genetic background. The animals were orally treated by fenofibrate and acute phase genes expression was induced after intra-peritoneal injection of either IL-1, IL-6 or LPS. Activation of PPAR α _{WT} by fenofibrate still activated the expression *ACO*, a typical PPAR α target gene in mice, whereas PPAR α _{dis} was ineffective (data not shown). We thus examined hepatic gene expression of *IL-6* (as an IL-1 target gene), *fibrinogen- α* and *SAA* genes as representative genes of the IL-1 mediated APR (Fig. 6). The induction of *SAA* and *IL-6* genes expression by IL-1 was not prevented by fenofibrate treatment as expected in PPAR α deficient mice hydroporated with the empty vector (Fig. 6A,B). Expression of PPAR α _{dis} restored the inhibitory effect of the PPAR α agonist fenofibrate on the IL-1-stimulated APR to the same extent as done by expressed PPAR α _{WT}. Similar results were observed when mice were treated with IL-6 (Fig. 6C,D). Indeed, treatment of PPAR α -deficient mice by IL-6 resulted in a strong induction of *SAA* and *fibrinogen- α* gene expression that was not affected by fenofibrate treatment. This stimulation was drastically attenuated by PPAR α ligand in PPAR α _{WT} expressing mice as well as in PPAR α _{dis} expressing mice. *In vivo* stimulation of the APR by IL-1 or IL-6 constitutes an individual inflammatory response. Besides, bacterial endotoxin LPS is a potent initiator of inflammation and APR (37). Thus, we further investigated the global suppressive action of PPAR α _{dis} in the broader context of LPS-induced APR gene expression (Fig. 6E,F). LPS treatment of PPAR α -deficient mice led to the stimulation of both *SAA* and *fibrinogen- α* gene expression. As observed for IL-1 and IL-6-induced APR, the LPS-induced *SAA* and *fibrinogen- α* gene expression was significantly prevented in fenofibrate-treated PPAR α _{WT} expressing mice. Interestingly, fenofibrate treatment of PPAR α _{dis} expressing mice inhibited LPS-induced *SAA* and *fibrinogen- α* gene expression. These results demonstrate that activated PPAR α _{dis} is capable, *in vivo*, for blocking both pro-inflammatory cytokine- and endotoxin-mediated induction of APR genes in liver whereas it is unable to transactivate lipid catabolism-related target gene.

PPAR α _{dis} displays intact anti-inflammatory properties

As we demonstrated above, PPAR α _{dis} prevents LPS-induced APR gene expression in liver. LPS also triggers signal transduction pathways to release various cellular mediators, including the pro-inflammatory cytokines TNF, IL-1 and IL-6 (38,39). Therefore, we tested whether

PPAR α_{dis} could influence *TNF*, *IL-1* and *IL-6* hepatic expression under LPS stimulation. LPS treatment of PPAR α -deficient mice resulted in a strong raise of hepatic mRNA levels of *TNF*, *IL-1* and *IL-6* (Fig. 7A,B,C). As expected, fenofibrate treatment did not prevent this effect in PPAR α -deficient mice, but was efficient in PPAR α_{WT} expressing mice. Importantly, fenofibrate prevented the LPS-induced elevation of *TNF*, *IL-1* and *IL-6* hepatic mRNA levels in PPAR α_{WT} both and PPAR α_{dis} expressing mice. Interestingly, the negative effects of both PPAR α_{WT} and PPAR α_{dis} on liver mRNA levels under LPS stimulation were correlated with the decrease of plasma concentrations of pro-inflammatory cytokines TNF, IL-1 and IL-6 (Fig. 7D,E,F). Taken together, these results strongly demonstrate that the PPAR α_{dis} exhibits dissociated transactivation and transrepression properties *in vitro* and *in vivo* and that PPAR α control of inflammation is engaged independently of the activation of PPAR α target genes.

Hepatic transrepression function of PPAR α modulates vascular wall response to inflammatory cytokines

To assess a distal repercussion of liver-specific PPAR α transrepression function, we analyzed the expression genes encoding vascular adhesion molecules in aorta (40). Expression of pro-inflammatory genes vascular cell adhesion molecule (*VCAM-1*) and intercellular cell adhesion molecule (*ICAM-1*) were measured in aortas of hydroperated mice stimulated by LPS (Fig. 8). The expression of both *VCAM-1* and *ICAM-1* was markedly induced by LPS injection in PPAR α -deficient mice genetic background. Interestingly, this effect was significantly reduced in aorta of liver-specific PPAR α_{WT} and PPAR α_{dis} expressing mice. These data demonstrate that PPAR α is able to attenuate systemic and aortic inflammatory response by a transrepression mechanism occurring in the liver.

Discussion

PPAR α is now established as a major factor attenuating several cardiovascular risk factors. Beneficial effects of PPAR α activation are attributed to a combination between its crucial function in lipid homeostasis and in the control of inflammation. However, findings emerged from clinical studies do not bring an evaluation of the relative contribution of metabolic normalizing activities from control of inflammation following pharmacological activation of PPAR α . In addition, the impact of PPAR α -mediated attenuation of inflammation alone has been hardly investigated *in vitro* and *in vivo* using available laboratory models. The aim of this study was to explore the hypothesis of a plausible

dissociation between activation and repression of PPAR α target genes and subsequent biological changes. Based on mutation strategy we provide here the first proof that transactivation and transrepression properties of PPAR α can be dissociated (41). Moreover, we found that PPAR α controls hepatic inflammation response and circulating levels of proinflammatory cytokines in a DNA binding-independent manner.

Studies on structure function relationship among other nuclear receptors support the idea that the DNA binding of PPAR α is not required for its transrepressing activity. An example is the observation that point mutation in the DBD of the glucocorticoid receptor (GR) led to the dissociation of its activities. Indeed, with the GR^{dim/dim} mice (a GR DNA-binding defective mutant), it has been demonstrated that inflammatory responses in the living animal are repressed efficiently in the absence of the binding of GR on DNA (42). Since activation of PPAR α target genes need an intact DBD, mutations were designed in order to impair DNA binding of PPAR α to PPRES expecting an abolishment of transactivation mechanism as well. Among several mutations tested, some of them did not affect the transactivation function of PPAR α . For instance, PPAR α _{D140C} remains fully able to bind DNA and to induce transcriptional activation of reporter genes (data not shown). However, substitution of the arginine 150 by glutamine giving rise to PPAR α _{R150Q} (PPAR α _{dis}) was found to abolish the binding of PPAR α protein to PPRES. Accordingly, the mutated receptor exhibited a complete loss in transcriptional activation *in vitro* that was found independent of the diversity or the concentrations of ligands tested. We demonstrated *in vitro* that a point mutation in the second zinc finger of PPAR α is sufficient to impair transactivation activity abolishing up-regulation of metabolism-related gene.

PPARs interact with several transcription factors involved in inflammatory signaling (5,23). By contrast to DNA binding function, these interactions are not harbored by a well-defined domain in PPAR α protein. Transcription of target genes induced by pro-inflammatory cytokines is mediated by a number of transcription factors among which p65 and c-Jun that are components of NF κ B and AP-1 complexes respectively (43). Here, we observed that PPAR α _{dis} physically and functionally interacts with both p65 and c-Jun in a similar manner compared to PPAR α wild-type. In addition, expression of PPAR α _{dis} in human hepatoma cells revealed its ability to interfere with both IL-1 and IL-6 signalling through a direct effect on the hepatocyte. Indeed, whereas being unable to transactivate target genes, PPAR α _{dis} behaves as a repressor of both IL-1 and IL-6-stimulated transcription of endogenous *SAA*, *fibrinogen* and *IL-6* genes. These data demonstrate that although PPAR α is unable to transactivate the

expression of target genes involved metabolism, it remains a potent repressor of inflammation signaling pathways *in vitro*.

In previous studies, we demonstrated that PPAR α is a major modulator of the APR *in vivo*. Among liver specific genes whose expression is stimulated during the APR are *fibrinogen*, *SAA* and *IL-6* itself. IL-1 and IL-6 are major cytokines that control acute phase protein biosynthesis in response to trauma or inflammation. The control of the APR by PPAR α activation was used as a model to investigate whether PPAR α may exhibit dissociated transactivation/transrepression functions *in vivo*. We found here that liver-specific restoration of PPAR α in PPAR α -deficient genetic background was sufficient to attenuate cytokine-mediated stimulation of the APR. Experiments performed with PPAR α_{dis} demonstrate that the control of APR signaling by PPAR α is selectively due to transrepression mechanism. These effects were not specific of IL-1 cytokine but also applied to IL-6 signaling pathway. In addition, we found in the broader context of inflammation stimulated by LPS that PPAR α_{dis} exhibited similar effects. Therefore, our work is the first validation of the concept proposing that transactivation and transrepression mechanisms mediated by PPAR α are dissociated properties. Of note, although PPREs could be found in the promoter of inflammatory responsive genes such I κ B (44), it appears from our data that transrepression mechanism is responsible for the overall control of the APR by PPAR α .

Since acute and chronic phase of inflammation are orchestrated by common mechanisms and actors of cytokine signaling networks, it is a rationale to expect that mechanisms of action of PPAR α identified in our study will be relevant for the modulation of chronic inflammation. Chronic inflammation potentiates and strongly increases the risk of developing atherosclerosis. In addition, such a state is reported as the hallmark of many other diseases including rheumatoid arthritis, atopy, multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus, inflammatory bowel disease *etc*. Deleterious effects are linked in part, to the persistent elevation of circulating pro-inflammatory cytokines. Our results obtained from experiments based on LPS stimulation revealed also important new aspects regarding of transrepression functions of PPAR α occurring into the liver and its systemic propagation. Indeed, whereas PPAR α -deficient mice background responded by a strong elevation of circulating levels of TNF, IL-1 and IL-6 cytokines upon LPS stimulation, this effect was drastically prevented after restoration of hepatic expression of PPAR α_{dis} . These findings demonstrate that PPAR α may decrease circulating inflammatory mediators through a transrepression mechanism operating in liver. Hepatic activation of PPAR α will have

distal repercussion on cytokine networks in other tissues involved in a diversity of pathology such as vascular wall cells or cells of the immune system. A first proof was provided by our recent findings (36). Indeed, we found that in conditions of infection/inflammation mimicked by LPS, the circulating pool of TNF/IL-1/IL-6 cytokines is mainly of hepatic origin. Second, selective hepatic activation of PPAR α decreases cytokine pool, an effect associated with the attenuation of inflammatory gene response at the vascular wall level. Here, we demonstrate that PPAR α transrepression mechanism occurring in the liver is responsible for the modulation of *VCAM-1* and *ICAM-1* gene expression in aorta. These genes are among those reported as proatherogenic when stimulated in vascular cells during inflammation (45,46). We therefore identified a crucial impact of liver-restricted transrepression function of PPAR α in limiting propagation of inflammation to the whole body.

On the basis of current knowledge, it is now postulated that PPARs may be targeted by various ligands that may display at least partial distinguishable biological properties. The concept of SPPARMs (selective PPARs modulators) has been proposed (16). A SPPARM will induce a selective regulation of target genes depending on the nature of the receptor-ligand complex and the cellular and tissue context. This regulation, thought to be mainly based on the differential recruitment of transcription cofactors leads to specific distinguishable biological effects. Based on a biological approach, our findings demonstrating the possibility to dissociate PPAR α modes of action (*e.g.* activation and repression). Therefore, enhancing one of these mode of action may constitute an innovative basis to design specific PPAR α agonists. Indeed, it is conceivable that PPAR α ligands may specifically attenuate inflammatory signaling and related disorders independently from its direct metabolic action. For instance, the development of PPAR α agonists aimed at exerting selective modulation of inflammation in the context of atherogenic risks factors becomes a rational perspective. In addition, activation of PPAR α might correct dyslipidemia triggered by inflammatory mediators. Because inflammation and dyslipidemia are tightly associated to metabolic and cardiovascular diseases, the identification of PPAR α a common molecular target with dissociable mechanism of action is very attractive for the new drug discovery.

Experimental procedures

Plasmids constructions

The cDNA encompassing the mouse PPAR α wild type (PPAR α_{WT}) was inserted into the pBK-CMV expression vector. Point mutations in the PPAR α were constructed by site directed mutagenesis using Quick-Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands). The aspartic residue at position 140 has been mutated to cysteine (PPAR α_{D140C}) or the arginine at position 150 changed to glutamine (PPAR α_{R150Q} , PPAR α_{dis}). The mutated cDNA have been completely sequenced. PPRES-driven reporter genes are composed of the DR1 consensus motif AGGTCA A AGGTCA or six copies of the native PPRE located in the regulatory region of the human ApoA2 gene (47). Promoter-driven reporter genes are composed of a 230-base pair genomic fragment of rat acyl-CoA oxidase (*ACO*) promoter or a 600-base pair genomic fragment of the human carnitine palmitoyl-transferase I (*CPT-1*) promoter cloned into pGL3 reporter plasmid (Promega, Charbonnières, France). The Fibrinogen- β promoter-, NF κ B-response element- and the IL-6 promoter-driven reporter constructs were previously described (6,7). Each driven reporter genes are coupled to the *firefly* luciferase reporter. The pRSV-p65 was previously described (10).

Cell culture, transfection assays and Western Blot analysis

HepG2 cells were grown in MEM containing 10% foetal calf serum (FCS) (Invitrogen Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), 2mM glutamine, 25 μ g/mL gentamycine, 1mM sodium pyruvate, and non-essential amino acids (Invitrogen) in a 5% CO $_2$ humidified atmosphere at 37°C. For reporter assays, HepG2 cells were transiently transfected with reporter and expression plasmids using ExGen 500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France) according to the manufacturer's protocol. The total amount of DNA was equalized to 0.5 μ g by adding pBSSK $^+$ vector. After a 5 h incubation period, cells were treated, in MEM 0.2% FCS and Wy14,643, fenofibric acid, GW9578 or vehicle (dimethylsulfoxide, Me $_2$ SO) and IL-1 (10 ng/mL) or IL-6 (20 ng/mL). Cells extracts were prepared using Reporter Lysis Buffer (Promega, Charbonnières, France), and luciferase and β -Galactosidase activities were measured as previously described (10). For endogenous gene expression assays, HepG2 cells were transiently transfected with 1 μ g of the control empty vector pBK-CMV or PPAR α_{WT} or PPAR α_{dis} expression vectors using GeneJammer reagent (Stratagene) according to the manufacturer's protocol. After 24 h, cells were treated with PPAR α agonists and cytokines (as indicated in figure legends) before RNA extraction. For Western blot (WB) analysis, protein extracts from transiently transfected cells were subjected to SDS-PAGE

electrophoresis, transferred to nitrocellulose and probed with the anti-PPAR α or anti- β Actin specific anti-bodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) as the primary antibody and detected using the ECL (enhanced chemiluminescence) (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France).

Reagents

Wy14,643 and fenofibric acid were from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) and Laboratoires Fournier (Dijon, France) respectively were dissolved in DMSO (Me₂SO) for *in vitro* experiments. Fenofibrate suspended in 1% carboxymethylcellulose (CMC, low viscosity, Sigma) in water was administered by gavage at a dose of 200 mpk. Control animals received equivalent volumes (100 μ l) of 1% CMC suspension in similar conditions. For treatment of mice, human or murine recombinant IL-1 and IL-6 (500 ng per mouse) (Tebu Le Perray-en-Yvelines, France) and LPS (*Escherichia coli*, serotype 055:B5, Sigma) (50 μ g per mouse) prepared in saline 9 g/L was administered by peritoneal injection.

Electrophoretic Mobility Shift Assays

DR1-consensus, human hydroxymethyl-glutaryl-CoA synthase (*HMG-CoA synthase*), human *CPT-1* and *ACO* PPREs were used as indicated in figure legends. Mouse PPAR α _{WT} and PPAR α _{R150Q} proteins were obtained using *in vitro* transcription and translation T3 TNT^R-coupled reticulocyte lysate system (Promega, Charbonnières, France). Translation was followed by SDS-PAGE analysis and visualized by immuno-blotting using a PPAR α specific antibody (Santa Cruz) to assess the correct size of translated proteins. *In vitro* translated proteins were pre-incubated for 10 minutes at room temperature in a total volume of 20 μ L containing 0.5 μ g poly(dI-dC) in the following binding buffer: Hepes 10 mM pH7.8, NaCl 100mM, EDTA 0.1mM, DTT 0.5 mM, bovine serum albumin 1 mg/mL and glycerol 10 %. The radiolabeled probes (1x10⁵ cpm of ³²P-labelled probe) were added and the binding reaction was incubated for a further 15 min at room temperature. The proteins-DNA complexes were resolved on 6% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis in a 0.5% Tris-Borate-EDTA running buffer at room temperature, and visualized after autoradiography.

In vitro protein-protein interaction assays (GST Pull down)

0.5 μ g of recombinant GST-p65, or GST-cJun bound to glutathione-Sepharose 4B beads was incubated with 5 μ L of ³⁵S radio-labeled *in vitro* synthesized proteins in a total volume of 200

μL of incubation buffer as previously described (6). The supernatant was loaded on a SDS-PAGE. After drying, bands were visualized by autoradiography.

RNA analysis

RNA from cells or tissues were extracted with *TRIzol* reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) using the supplier's instructions. Reverse transcription was realized on 1 μg RNA using random hexameric primers and Superscript reverse transcriptase (Invitrogen). cDNA levels were measured by real-time quantitative PCR using Brilliant SYBR Green Q-PCR Master Mix (Stratagene) on the Mx4000 detection system (Stratagene) using the specific primers. PCR amplification was performed in a total volume of 20 μL containing 100 nM of each primer. The conditions were 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C. For each primer pair, the linearity of the reaction was confirmed to have a correlation coefficient at 0.98 and a PCR efficiency of 100% over the detection area by measuring a 10-fold dilution curve with cDNA from mouse liver extract. Samples were analyzed in duplicate and normalized to the cyclophilin values as internal control. PCR was performed with oligonucleotides: 5' - ACA GTC GGT GAG GCC TCT TAT GAA and 5' - TCT TGC TGC CTG AAT GTG AGT TGG for *hCPT-1*; 5'-GGT TAC GGC TTG CCA ATT TCT CGT C and 5'-TTG GGA TAC ACC AGT CAT CAG CCT C for *hPDK4*; 5'-TTC TGC TCC CTG CTC CTG-3' and 5'-GTA ATT GGG GTC TTT GCC-3' for *mSAA*; 5'-CTG CAG AAG TGA TCA GCG and 5'-ATT GTG TAC CCT CTC CCC for *hSAA*; 5'-GGC TCA GAC TCT GGG AAC TTT AG -3' and 5'-GAA CGA TGT GTG GTG CTT GTG -3' for *mfibrinogen-α*; 5' - CTG AAA GAC CTG TGG CAA AA and 5' - TCC AGG ATT GAA CGA AGC ACA CG for *hfibrinogen-β*; 5'-AGC ACA GAA AGC ATG ATC CG -3' and 5'-CCC GAA GTT CAG TAG ACA GAA GAC-3' for *mTNF*; 5'-CCA GTT GCC TTC TTG GGA CTG-3' and 5'-CAG GTC TGT TGG GAG TGG TAT CC-3' for *mIL6*; 5'-TCG GTA CAT CCT CGA CGG CAT C and 5'-CAT TTG TGG TTG GGT CAG GGG TG for *hIL-6*; 5'-GAA TGA CCT GTT CTT TGA AGT T-3' and 5'-TTT TGT TGT TCA TCT CGG AGC C-3' for *mIL-1*; 5'-AAC CGA ATC CCC AAC TTG TGC AG-3' and 5'-TCT CCA GCT TCT CTC AGG AAA TGC C-3' for *mVCAM-1* and 5'-CCT GGC CTC GGA GAC ATT AGA GAA C-3' and 5'-ACC CCA AGG AGA TCA CAT TCA CGG-3' for *mICAM-1*. Quantification of mRNA expression was corrected using *cyclophilin* gene expression as a internal control with the primers 5'-GCA TAC GGG TCC TGG CAT CTT GTC C-3' and 5'-ATG GTG ATC TTC TTG CTG GTC TTG C-3'. Statistical analysis was performed using Student's *t* test, **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001.

Animal studies and hydroporation experiments

Animal studies were performed in compliance with European Community specifications regarding the use of laboratory animals. The Nord-Pas de Calais Ethical Committee for animal use approved the animal experiments. Experiments were performed on 10 weeks old PPAR α -null female mice on a C57Bl6/J genetic background. Animals were killed by exsanguination under anesthesia. Livers and aorta were removed. Rapid tail vein injection (hydroporation) was performed as previously described (36). Mice were anaesthetized by intraperitoneal injection with a solution of domitor (0.68 mpk) / ketamin (67 mpk) (Orion Pharma, Espoo, Finland/Virbac, Carros, France) and were allowed to recover on cotton

following subcutaneous injection of the antidote antisedan at 1.7 mpk (Orion Pharma). Fenofibrate (FF) treatment was performed by gavage (200 mpk). Mice received the first gavage 8 hours post-hydroperation and the second one 24 hours post-hydroperation and were subjected to peritoneal injection of either murine IL-1 or murine IL-6 or LPS 1 hour later. After a total 3h period, mice were anaesthetized and then sacrificed. Each group was composed of 5 mice.

Plasma cytokine concentrations

Plasma levels of TNF, IL1 or IL6 were determined by ELISA (R&D systems Europe) following manufacturer's instructions. Statistical analysis was performed using Student's *t* test, **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001.

Acknowledgements

Grants : Roxane Mansouri was supported by a grant from Région-Nord-Pas de Calais / Institut Pasteur de Lille and a grant from the Nouvelle Société Française d'Athérosclérose.

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche and Genfit SA (project acronym: COMAX.) the Région Nord-Pas de Calais/FEDER, the Fondation Coeur et Artères and the European Vascular Genomics Network.

Author Contributions

Both authors have equally contributed to the work (hypothesis, experimental investigations, data analysis and paper redaction)

References

1. Issemann I & Green S (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**, 645-650.
2. Issemann I, Prince RA, Tugwood JD & Green S (1993) The retinoid X receptor enhances the function of the peroxisome proliferator activated receptor. *Biochimie* **75**, 251-256.
3. Shulman AI & Mangelsdorf DJ (2005) Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med* **353**, 604-615.
4. Gervois P, Torra IP, Fruchart JC & Staels B (2000) Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin Chem Lab Med* **38**, 3-11.
5. Gervois P, Fruchart JC & Staels B (2007) Drug Insight: mechanisms of action and therapeutic applications for agonists of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**, 145-156.
6. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G & Staels B (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* **274**, 32048-32054.
7. Gervois P, Vu-Dac N, Kleemann R, Kockx M, Dubois G, Laine B, Kosykh V, Fruchart JC, Kooistra T & Staels B (2001) Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem* **276**, 33471-33477.
8. Gervois P, Kleemann R, Pilon A, Percevault F, Koenig W, Staels B & Kooistra T (2004) Global suppression of IL-6-induced acute phase response gene expression after chronic in vivo treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate. *J Biol Chem* **279**, 16154-16160.
9. Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P & Plutzky J (1999) PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* **99**, 3125-3131.
10. Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, *et al.* (1998) Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* **393**, 790-793.
11. Vanden Berghe W, Vermeulen L, Delerive P, De Bosscher K, Staels B & Haegeman G (2003) A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR. *Adv Exp Med Biol* **544**, 181-196.
12. Kleemann R, Gervois PP, Verschuren L, Staels B, Princen HM & Kooistra T (2003) Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation. *Blood* **101**, 545-551.
13. Forman BM, Chen J & Evans RM (1997) Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4312-4317.
14. Robillard R, Fontaine C, Chinetti G, Fruchart JC & Staels B (2005) Fibrates. *Handb Exp Pharmacol*, 389-406.
15. Staels B & Fruchart JC (2005) Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* **54**, 2460-2470.

16. Pourcet B, Fruchart JC, Staels B & Glineur C (2006) Selective PPAR modulators, dual and pan PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Expert Opin Emerg Drugs* **11**, 379-401.
17. Keating GM & Croom KF (2007) Fenofibrate: a review of its use in primary dyslipidaemia, the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Drugs* **67**, 121-153.
18. Chang F, Jaber LA, Berlie HD & O'Connell MB (2007) Evolution of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Ann Pharmacother* **41**, 973-983.
19. Ross R (1999) Atherosclerosis is an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-126.
20. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE & Mohamed-Ali V (2000) Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* **148**, 209-214.
21. Hoffmeister A, Rothenbacher D, Bazner U, Frohlich M, Brenner H, Hombach V & Koenig W (2001) Role of novel markers of inflammation in patients with stable coronary heart disease. *Am J Cardiol* **87**, 262-266.
22. Dhainaut JF, Marin N, Mignon A & Vinsonneau C (2001) Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med* **29**, S42-S47.
23. Zambon A, Gervois P, Pauletto P, Fruchart JC & Staels B (2006) Modulation of hepatic inflammatory risk markers of cardiovascular diseases by PPAR-alpha activators: clinical and experimental evidence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 977-986.
24. Gervois P & Mansouri R (2012) PPARalpha as a therapeutic target in inflammation-associated diseases. *Expert Opin Ther Targets* **16**, 1113-1125.
25. Rodriguez JC, Gil-Gomez G, Hegardt FG & Haro D (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem* **269**, 18767-18772.
26. Napal L, Marrero PF & Haro D (2005) An intronic peroxisome proliferator-activated receptor-binding sequence mediates fatty acid induction of the human carnitine palmitoyltransferase 1A. *J Mol Biol* **354**, 751-759.
27. Glass CK & Ogawa S (2006) Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* **6**, 44-55.
28. Munoz C, Pascual-Salcedo D, Castellanos MC, Alfranca A, Aragonés J, Vara A, Redondo JM & de Landazuri MO (1996) Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits the production of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human endothelial cells in response to inflammatory mediators: modulation of NF-kappa B and AP-1 transcription factors activity. *Blood* **88**, 3482-3490.
29. Akira S, Taniuchi T & Kishimoto T (1993) Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* **54**, 1-78.
30. Hagstrom JE (2003) Plasmid-based gene delivery to target tissues in vivo: the intravascular approach. *Curr Opin Mol Ther* **5**, 338-344.
31. Zhang G, Gao X, Song YK, Vollmer R, Stolz DB, Gasiorowski JZ, Dean DA & Liu D (2004) Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther* **11**, 675-682.
32. Zhang X, Dong X, Sawyer GJ, Collins L & Fabre JW (2004) Regional hydrodynamic gene delivery to the rat liver with physiological volumes of DNA solution. *J Gene Med* **6**, 693-703.
33. Al-Dosari MS, Knapp JE & Liu D (2005) Hydrodynamic delivery. *Adv Genet* **54**, 65-82.
34. Andre FM, Cournil-Henrionnet C, Vernerey D, Opolon P & Mir LM (2006) Variability of naked DNA expression after direct local injection: the influence of the injection speed. *Gene Ther* **13**, 1619-1627.
35. Liu F, Song Y & Liu D (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* **6**, 1258-1266.

36. Mansouri RM, Bauge E, Staels B & Gervois P (2008) Systemic and distal repercussions of liver-specific peroxisome proliferator activated receptor- α control of the acute phase response. *Endocrinology* **149**, 3215-3223.
37. Boosman R, Niewold TA, Mutsaers CW & Gruys E (1989) Serum amyloid A concentrations in cows given endotoxin as an acute-phase stimulant. *Am J Vet Res* **50**, 1690-1694.
38. Baumann H & Gauldie J (1994) The acute phase response. *Immunol Today* **15**, 74-80.
39. Hirano T (1998) Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* **16**, 249-284.
40. Galkina E & Ley K (2007) Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2292-2301.
41. Mansouri R (2007) *PPAR α : contribution globale dans le contrôle de l'inflammation liée aux risques cardio-vasculaires*. PhD Thesis, University Lille2, France.
42. Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P & Schutz G (1998) DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* **93**, 531-541.
43. Collins T & Cybulsky MI (2001) NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* **107**, 255-264.
44. Buroker N, Barboza J & Huang J-Y (2009) The IkB α gene is a peroxisome proliferator-activated receptor cardiac target gene. *FEBS J* **276**, 3247-3255.
45. Dansky HM, Barlow CB, Lominska C, Sikes JL, Kao C, Weinsaft J, Cybulsky MI & Smith JD (2001) Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 1662-1667.
46. Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, Lin AH, Melchior EP, Bullard DC & Beaudet AL (1997) Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 1517-1520.
47. Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B & Auwerx J (1995) Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest* **96**, 741-750.

Figure legends

Fig. 1. Characterization of DNA binding activity of PPAR α_{dis} mutant.

Schematic representation of the DNA Binding Domain (DBD) and amino acids sequence of the first (ZF1) and the second (ZF2) zinc finger structures of mouse PPAR α using standard one-letter amino-acid abbreviations and numbered from ATG start codon. Residues of the D-box and of the P-Box are indicated. The P-Box and D-Box regions are required for target site recognition and dimerization, respectively. (B) HepG2 cells were transiently transfected with the empty expression vector (e.v.) or expression vectors containing either PPAR α wild-type (PPAR α_{WT}) or PPAR α mutants (PPAR α_{D140C} or PPAR α_{R150Q} ; also termed PPAR α_{dis}) cDNA. After 24 h, total protein cell extracts were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. (C) Analysis of DNA binding capacities of PPAR α mutants by EMSA were performed using DR1 consensus (AGGTCA A AGGTCA), acyl-CoA oxidase (*ACO*), carnitine palmitoyl-transferase I (*CPT-1*) or hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (*HMG-CoA synthase*) PPRES ³²P-labeled probes in the presence of *in vitro* translated PPAR α_{WT} , PPAR α_{D140C} , PPAR α_{dis} , RXR α or unprogrammed lysate (Ctrl: control) as indicated.

Fig. 2. PPAR α_{dis} displays impaired PPRE-driven transactivation function.

HepG2 cells were transiently cotransfected with either the control empty vector (e.v.) or PPAR α_{wt} or PPAR α_{dis} expression vector and PPRE or promoter driven reporter construct. Cells were subsequently treated with Wy14,643 (10 μ M) or vehicle (Me₂SO) for 24 h and harvested for luciferase activity quantification and expressed relative to control set as 1. Transcriptional activity of PPAR α_{wt} and PPAR α_{dis} on (A) DR1- or (B) *ApoA2* PPRE-driven luciferase reporter constructs. Transcriptional activity of PPAR α_{wt} and PPAR α_{dis} on (C) *CPT-1* or (D) *ACO* promoter-driven luciferase reporter constructs.

Fig. 3. PPAR α_{dis} displays impaired DNA-binding dependent activation of gene expression.

(A) Relative comparison of transcriptional activity between PPAR α_{wt} and PPAR α_{dis} in response to increasing amounts of Wy14,643 (0.1, 1, 10, and 100 μ M) for 24 hours. (B) Transcriptional activity of PPAR α_{wt} and PPAR α_{dis} in response to PPAR α activators : Wy14,643 (10 μ M), Fenofibric acid (100 μ M) or GW9578 (500 nM). (C) and (D), HepG2 cells were transiently transfected with the control empty vector (e.v.) or PPAR α_{WT} or PPAR α_{dis} expression vectors and were subsequently treated with Wy14,643 (10 μ M) or

fenofibric acid (100 μ M) or vehicle (Me₂SO) for a further 24 h and harvested for endogenous PPAR α target gene expression analysis. Total RNA were extracted and subjected to quantitative RT-PCR analysis. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (*PDK4*) and *CPT1* mRNA were measured. Cyclophilin mRNA was measured as internal control. All results are expressed as means \pm SDs of 3 transfection experiments performed in triplicate.

Fig. 4. PPAR α_{dis} interacts with p65 and c-Jun.

Pull down assays using GST and GST-p65, or GST-cJun (as indicated) bound to glutathione-Sepharose beads and *in vitro* synthesized ³⁵S-labeled PPAR α_{WT} or PPAR α_{dis} proteins. The supernatant was loaded on a SDS-PAGE and visualized by autoradiography. The input represents 20% of the amount of the PPAR α protein. (B) HepG2 cells were transiently cotransfected with the control empty vector (e.v.) or the PPAR α_{WT} or PPAR α_{dis} expression vectors and the *NF κ B* response element driven luciferase reporter construct, with or without p65-NF κ B subunit expression vector. (C) Cotransfection experiments using the human *IL-6*-promoter driven luciferase reporter construct (*pIL-6*) stimulated or not by human IL-1 (10 ng/mL) for 4 hours. (D) Cotransfection experiments using human *fibrinogen- β* promoter driven luciferase reporter construct (*pFib- β*) stimulated or not by human IL-6 (20 ng/mL) for 6 hours. Results are expressed as means \pm SDs of 3 transfection experiments performed in triplicate.

Fig. 5. PPAR α_{dis} controls acute phase response gene expression induced by IL-1 and IL-6 *in vitro*.

HepG2 cells were transiently transfected with the control empty vector (e.v.) or PPAR α_{WT} or PPAR α_{dis} expression vectors. Cells were treated 3 h with Wy14,643 (10 μ M), fenofibric acid (FA) (100 μ M) or vehicle (Me₂SO) and stimulated for 21 h with cytokines as indicated. (A) and (B), measurement of Serum amyloid A (*SAA*) and *IL-6* mRNA expression in cells stimulated by human IL-1 (10 ng/mL). (C) and (D), measurement of *SAA* and *fibrinogen- β* mRNA expression in cells stimulated by human IL-6 (20 ng/mL). Total RNA were extracted and subjected to quantitative RT-PCR analysis. *Cyclophilin* mRNA was measured as internal control. Results are expressed as means \pm SDs of 3 transfection experiments performed in triplicate.

Fig. 6. PPAR α_{dis} attenuates acute phase response *in vivo*.

PPAR α or PPAR α_{dis} expression was restored in PPAR α deficient mice by rapid tail vein injection (hydroporation) as described in experimental procedures. Mice were treated with 200 mpk fenofibrate (FF) and

were subsequently stimulated for 3 hours with IL-1 (0.5 µg/mouse) (A) and (B), or IL-6 (0.5 µg/mouse) (C) and (D) or LPS (50µg/mouse) (E) and (F) as indicated. Total RNA was extracted from liver. SAA; Serum Amyloid A, *IL6* and *Fibrinogen-α* mRNA expression levels were measured by quantitative RT-PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Fig. 7. Liver-restricted PPAR α_{dis} activation lowers pro-inflammatory cytokine plasma levels.

PPAR α or PPAR α_{dis} expression was restored in PPAR α deficient mice by rapid tail vein injection as described in Materials and Methods. Control mice received empty vector (e.v.) or PPAR α expression vector (PPAR α). Mice were treated with 200 mpk fenofibrate (FF) and subsequently stimulated for 3 hours with LPS (50µg/mouse). (A), (B) and (C) Real time PCR analysis of liver gene expression for the indicated genes. Plasma levels of (D) TNF, (E) IL-1 and (F) IL-6 were determined by ELISA * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$

Fig. 8. Hepatic transrepression activity of PPAR α_{dis} prevents expression of adhesion molecule at the vascular wall level.

PPAR α or PPAR α_{dis} expression was restored in PPAR α deficient mice by rapid tail vein injection as described in Materials and Methods. Control mice received empty vector (e.v.) or PPAR α expression vector (PPAR α). Mice were treated with 200 mpk fenofibrate (FF) and subsequently stimulated for 3 hours with LPS (50µg/mouse). Real time PCR analysis of *VCAM-1* (A) and *ICAM-1* (B) gene expression in aorta. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$

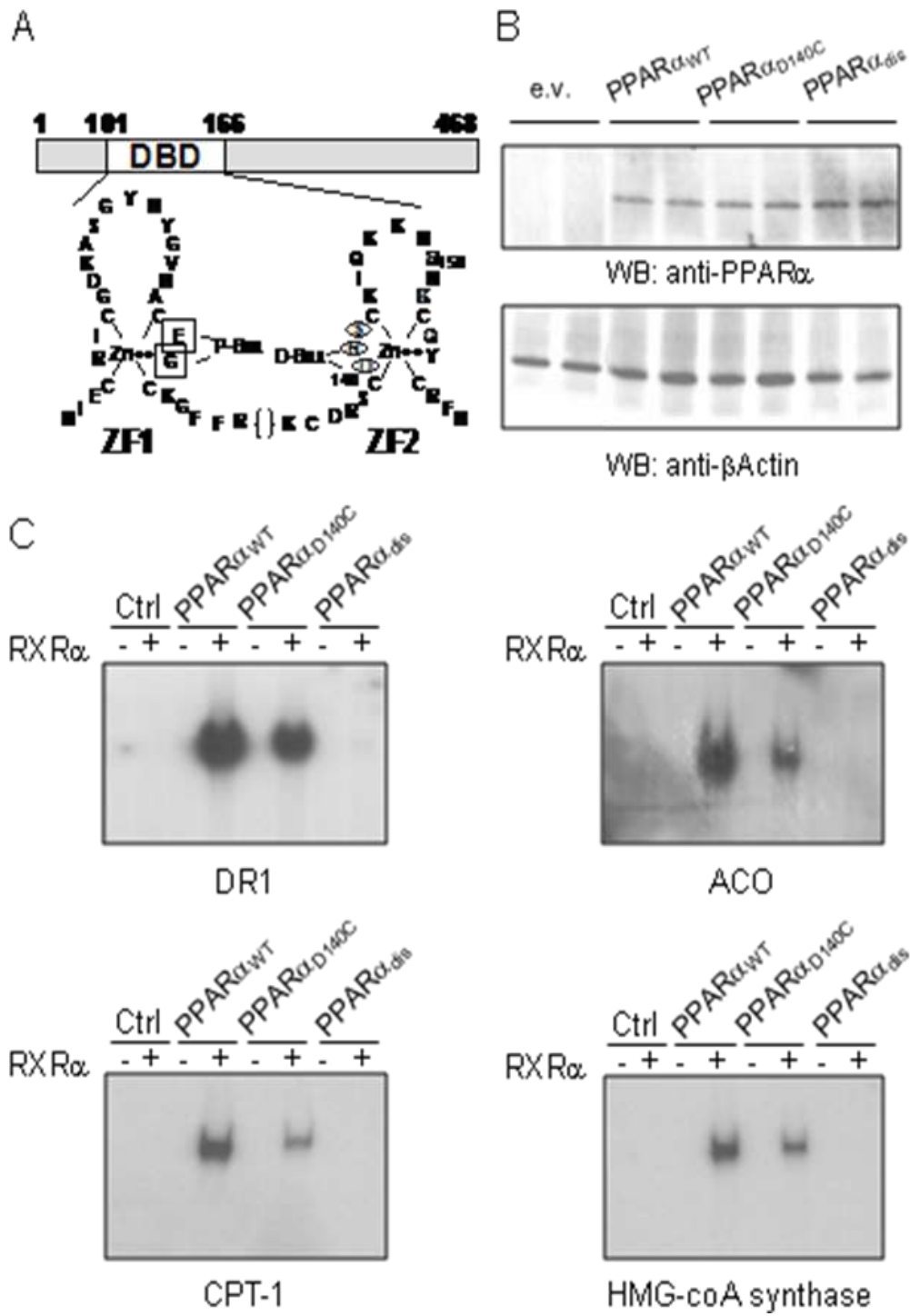


Figure 1

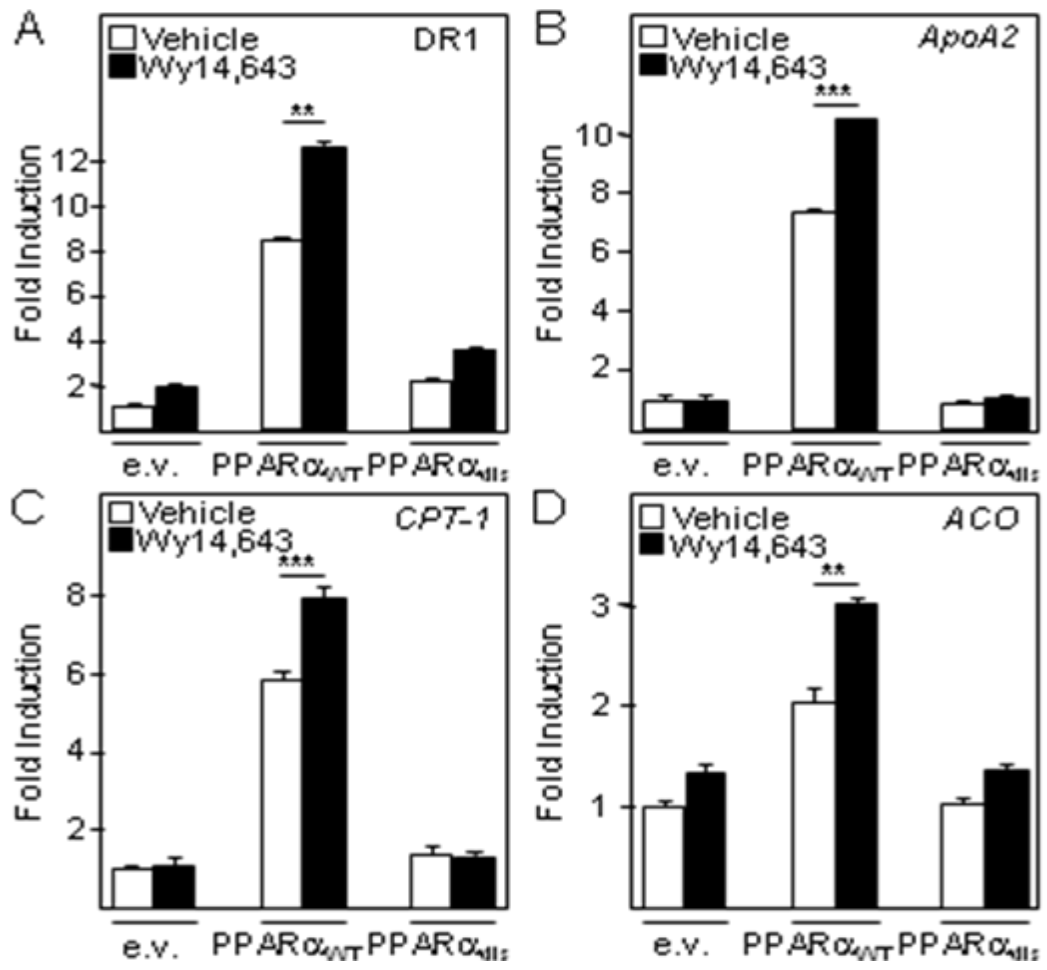


Figure 2

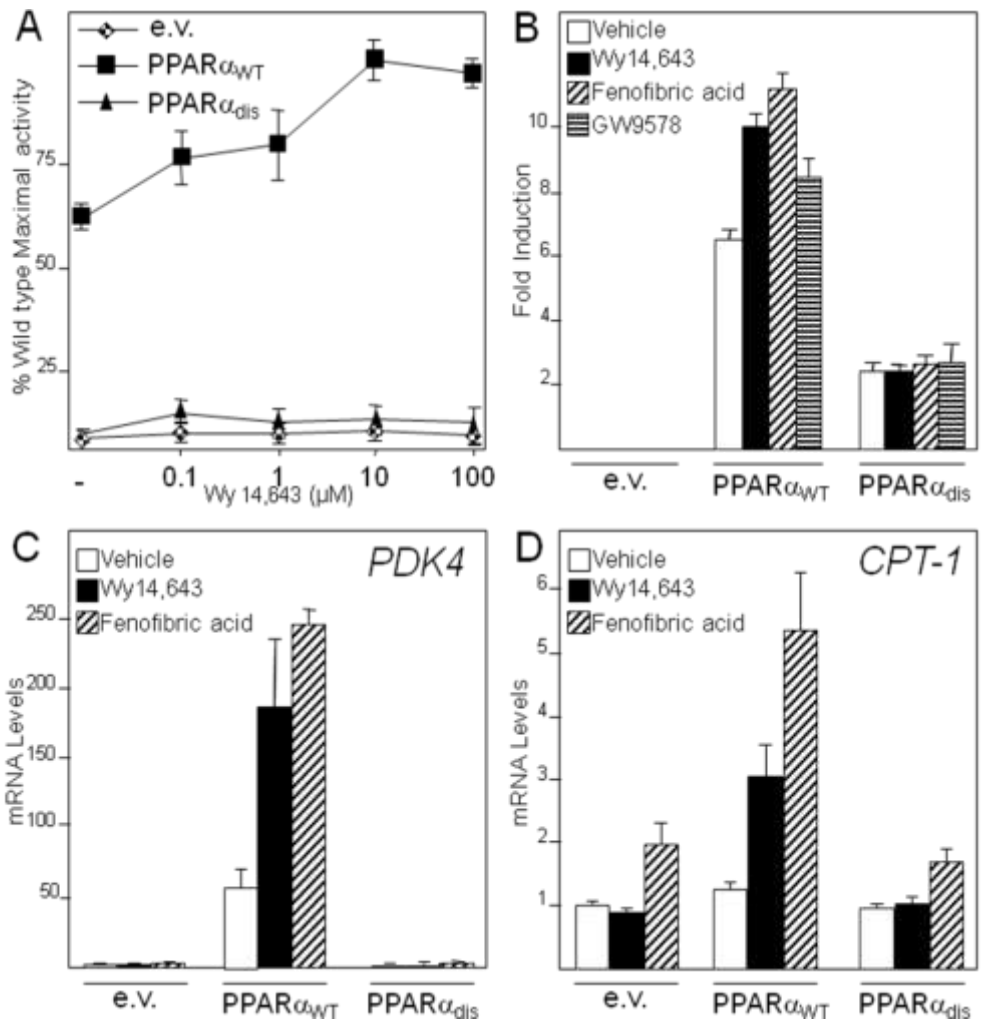


Figure 3

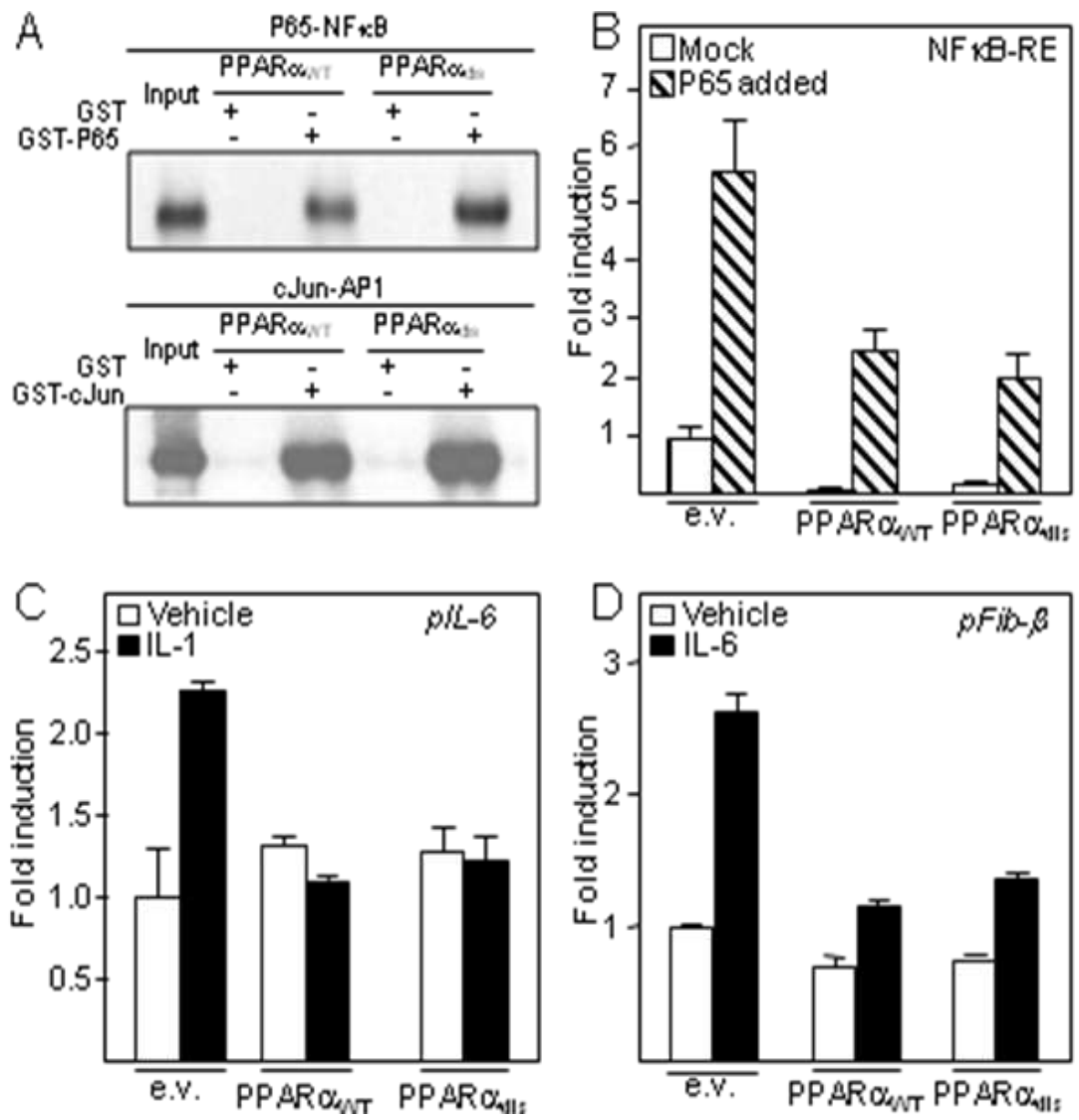


Figure 4

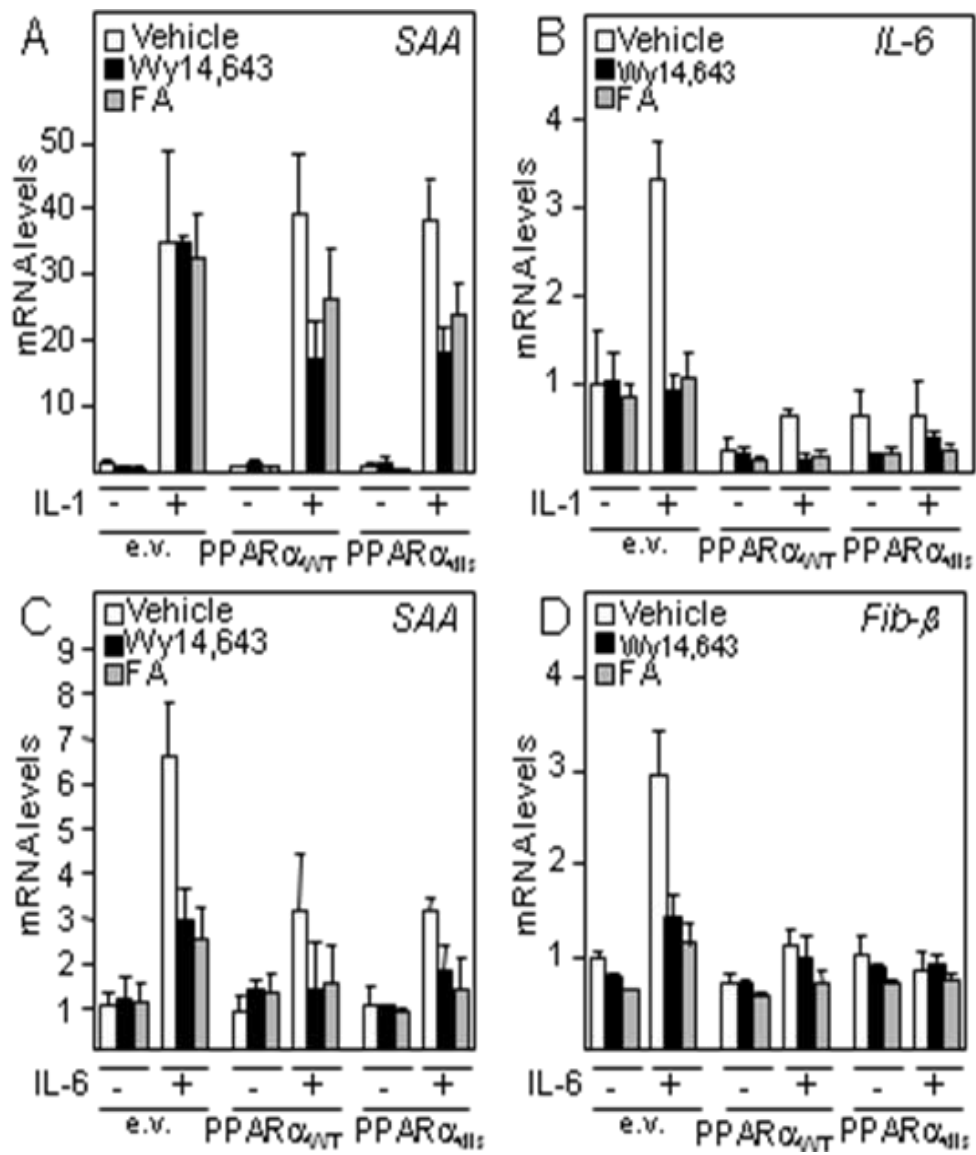


Figure 5

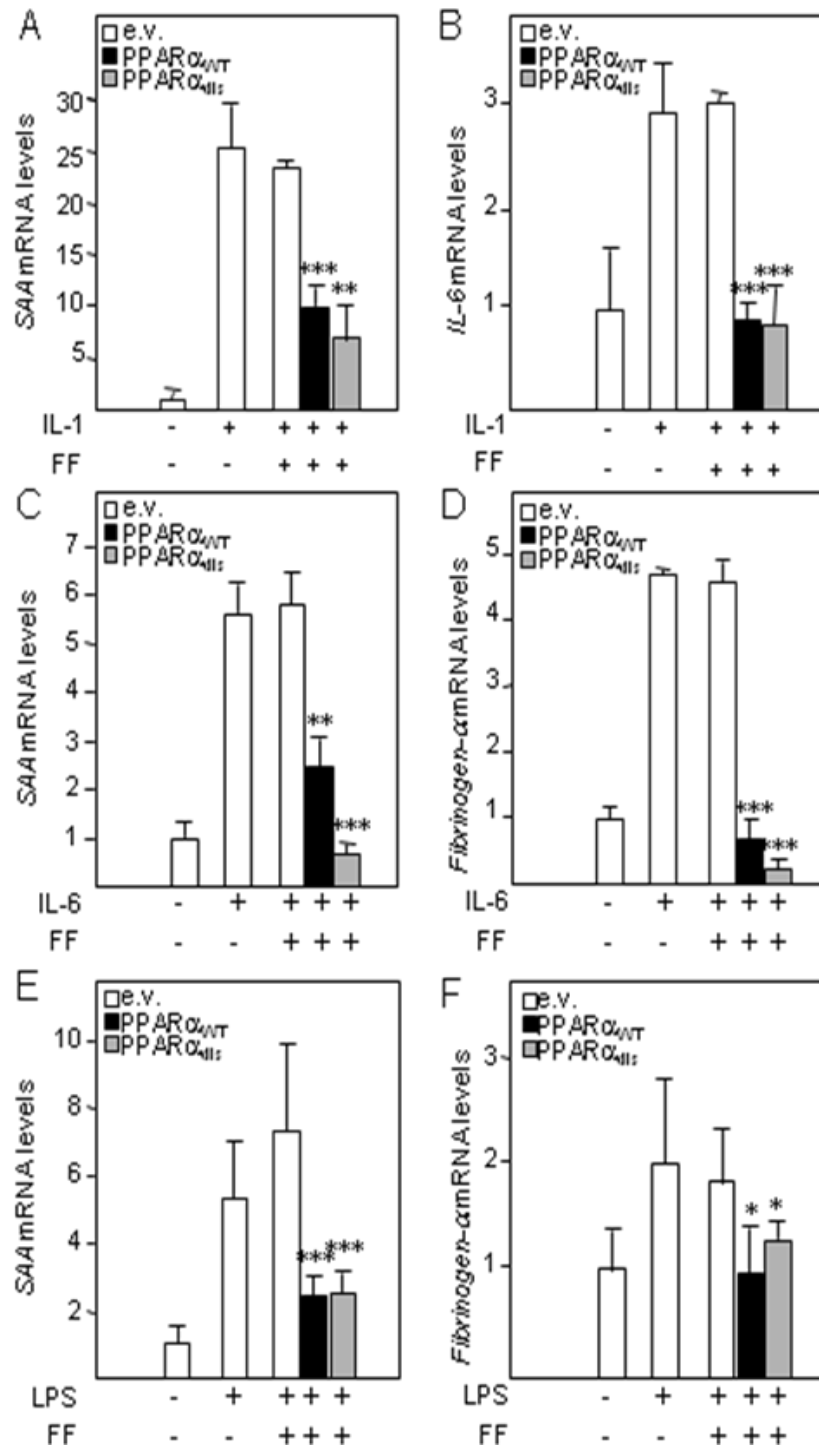


Figure 6

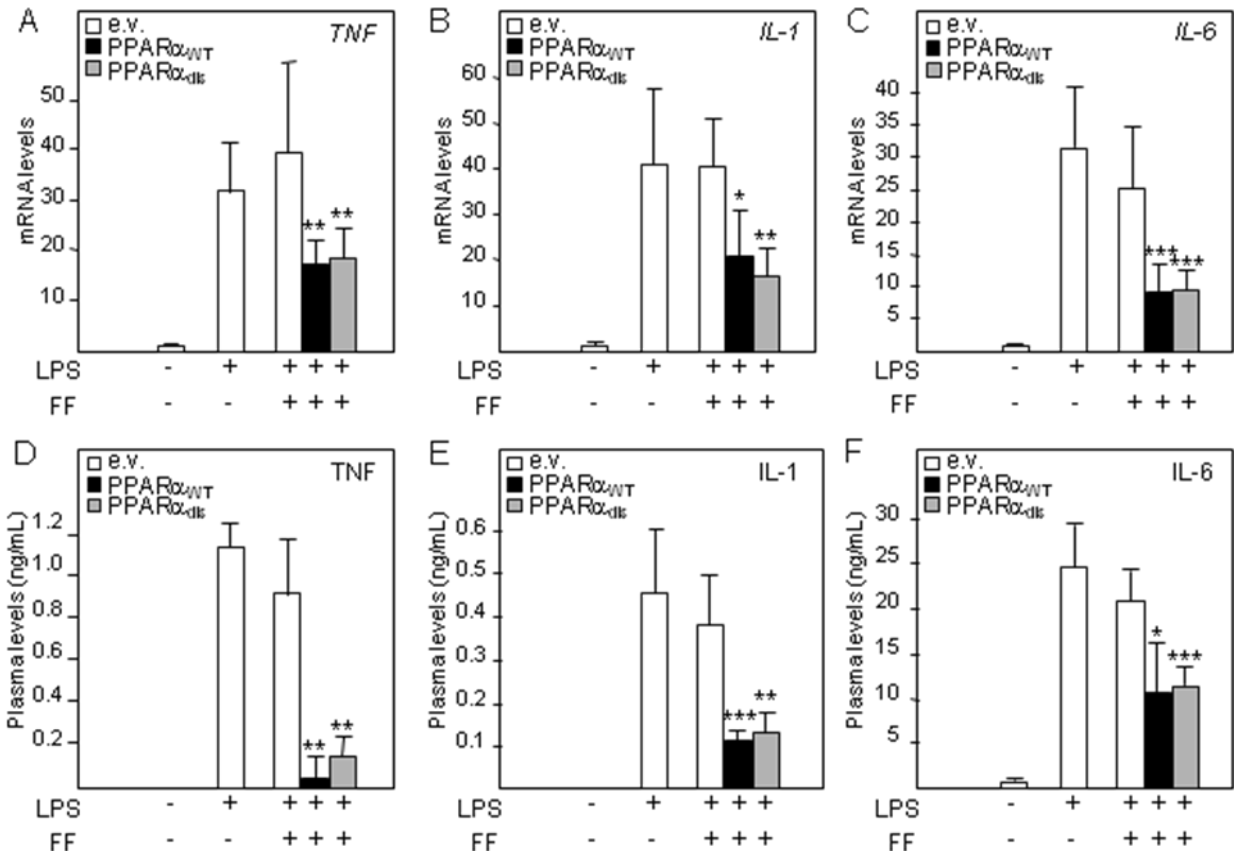


Figure 7

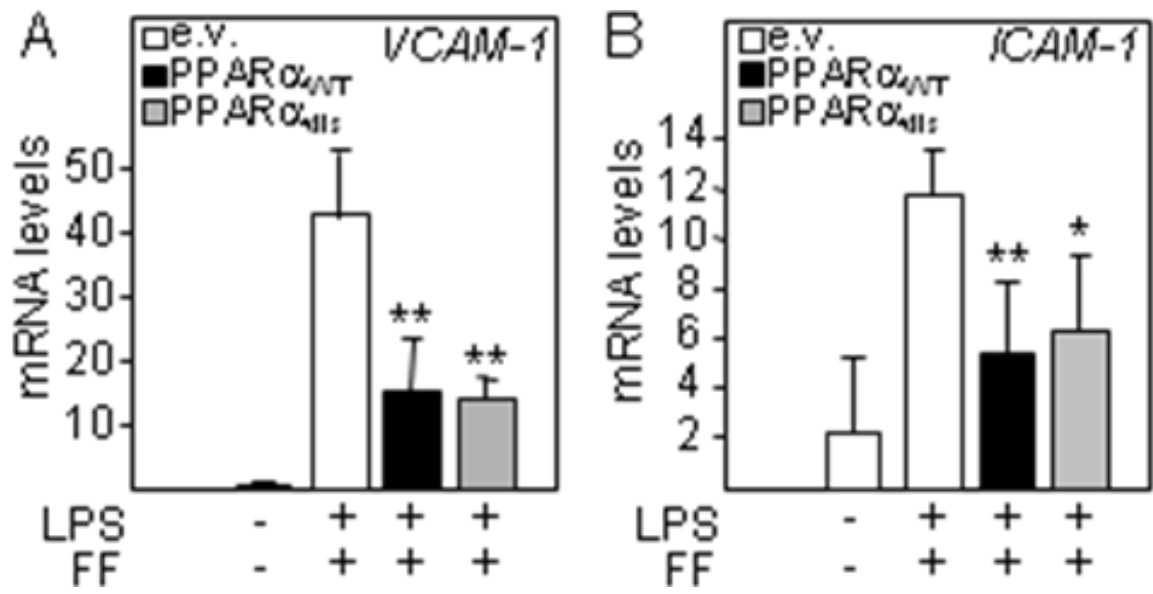


Figure 8

Perspectives thérapeutiques : concepts émergents

Les fibrates sont utilisés avec succès dans le traitement des hypertriglycéridémies et ont fait l'objet de nombreuses études cliniques. Chez les patients hypertriglycéridémiques, les fibrates diminuent les concentrations en triglycérides et augmentent les concentrations de HDL-C généralement diminuées chez ces patients. De plus, ils sont utilisés dans le traitement des dyslipidémies mixtes de type IIb (augmentation des LDL et VLDL, due à une surproduction hépatique de VLDL) et III (augmentation des IDL, due à la présence d'une apoE anormale non reconnue par les récepteurs). L'hypercholestérolémie, quant à elle, n'est pas l'indication principale des fibrates car, bien qu'ils puissent diminuer les concentrations de LDL-C, leur réponse est assez hétérogène. De plus, plusieurs études cliniques ont montré que les fibrates diminuent la progression des lésions athérosclérotiques chez l'Homme (107, 108, 109, 110).

L'ensemble des données bibliographiques montre que PPAR α est le médiateur de l'effet pharmacologique des fibrates. Il influence la formation et le développement des plaques d'athérome en contrôlant l'homéostasie lipidique et en diminuant la réponse inflammatoire vasculaire, la transformation des macrophages en cellules spumeuses, ainsi qu'en améliorant la fonction endothéliale et en diminuant la thrombogénicité et la fragilité de la plaque d'athérome. Cependant, l'absence de PPAR α dans un modèle de souris plus susceptible à développer l'athérosclérose (*apoe* KO) soumises à un régime pro-athérogène conduit à une diminution de la surface des lésions, bien que le profil lipidique soit plus athérogène (142). Une diminution de la pression artérielle pourrait être à l'origine de cette observation. Ainsi, l'activation de PPAR α n'entraîne pas une situation opposée lors de son absence. Par ailleurs l'activation de PPAR α permet au récepteur de moduler la signalisation inflammatoire.

La possibilité de modulation de l'activité de PPAR α par un ligand a encouragé de nombreuses recherches dans divers aspects de la biologie humaine. La pharmacologie de ce récepteur, l'identification de ligands naturels et le développement de ligands synthétiques de haute affinité ont facilité les travaux sur

les effets biologiques de ces récepteurs *in vitro* et *in vivo*. L'interaction ligand-récepteur nucléaire ne conduit pas à une simple modulation de type « tout ou rien » des gènes cibles mais s'opère de façon fine et coordonnée dans l'espace et le temps. La voie de signalisation des récepteurs nucléaires en général est d'une grande complexité et fait intervenir une combinaison de nombreux événements tels que par exemple : conformation du complexe ligand-récepteur, expression et disponibilité des cofacteurs de régulation, modification des facteurs de transcription par phosphorylation et ubiquitinylation, remodelage des complexes de transcription, accessibilité des régions régulatrices des gènes cibles.

Expérimentalement, il a été observé que les gènes cibles des récepteurs nucléaires peuvent être régulés différemment selon la nature du ligand étudié. Ces notions et observations sont à l'origine du concept des modulateurs sélectifs des récepteurs nucléaires (*Selective Nuclear Receptor Modulators = SnuRMs*). Ce concept, appliqué aux PPARs, définit le terme SPPARMs pour « *Selective PPAR Modulators* » (Figure 10) (104). Ainsi, on peut postuler qu'à la diversité chimique des complexes ligand-récepteur va correspondre une diversité de conformations du complexe conduisant à un recrutement différentiel de cofacteurs et à une modulation fine de la dynamique transcriptionnelle. Ceci expliquerait les différences subtiles de régulation de l'expression des gènes cibles. Ainsi émerge l'idée attrayante que plusieurs ligands partagent un seul et même récepteur pour provoquer des effets biologiques distincts. Dès lors, il est envisageable de développer des activateurs des PPAR à action plus ciblée et aux effets secondaires limités.

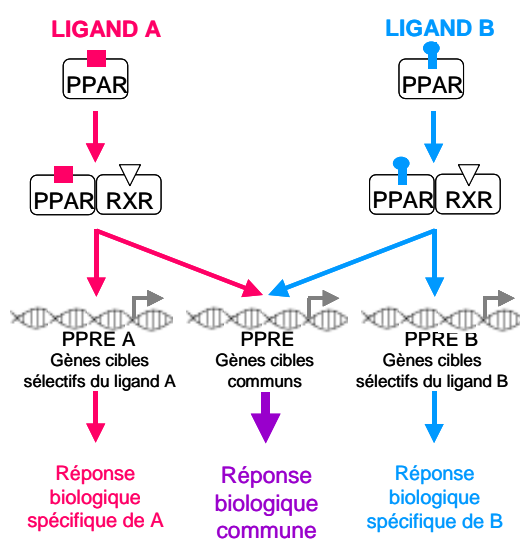


Figure 10 : Concept des ligands sélectifs des PPARs (« SPPARMs » = *Selective PPAR Modulator*)

La similarité de structure entre les PPARs offre une autre perspective. L'effet des glitazones sur le profil lipidique des patients diabétiques n'est pas optimal. Une activation combinée du PPAR α et du PPAR γ pourrait permettre une action complémentaire voire synergique par l'amélioration de l'homéostasie lipidique, de la sensibilité à l'insuline, de l'utilisation du glucose et du contrôle de l'inflammation. Un ligand commun pour le PPAR α et le PPAR γ pourrait également limiter les effets secondaires. Ainsi se dessine le concept des co-agonistes des PPARs (Figure 12) (159).

Des travaux pré-cliniques menés sur des animaux résistants à l'insuline sont assez encourageants. Le traitement par un co-agoniste PPAR γ/α améliore le profil lipidique et conserve les effets sur la glycémie et sur la sensibilité à l'insuline de façon comparable à ceux des agonistes de PPAR γ . Ces nouveaux concepts d'activation sélective ou combinée des PPARs sont encore en cours de validation. De nombreuses expertises sont encore nécessaires pour évaluer le bénéfice réel de ces nouvelles familles de composés.

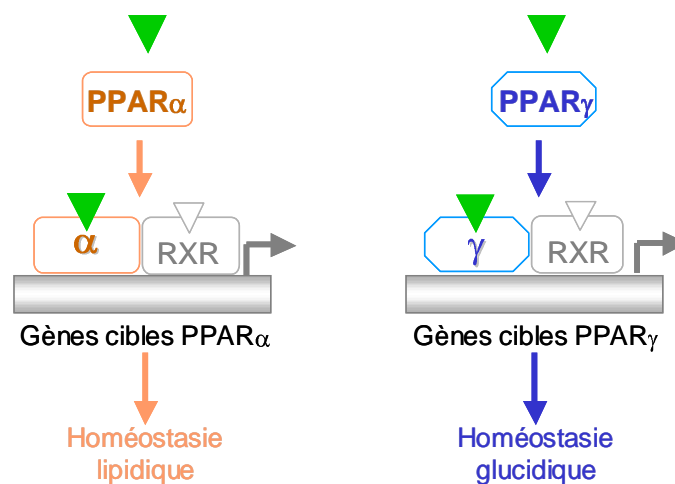


Figure 11 : Concept des ligands co-agonistes des PPARs

L'ensemble de ces propriétés confère à PPAR α un intérêt thérapeutique particulièrement intéressant pour le traitement de l'athérosclérose.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ** 1993 cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* 32:5598-604
2. **Jones PS, Savory R, Barratt P, Bell AR, Gray TJ, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Bell DR** 1995 Chromosomal localisation, inducibility, tissue-specific expression and strain differences in three murine peroxisome-proliferator-activated-receptor genes. *Eur J Biochem* 233:219-26
3. **Westin S, Kurokawa R, Nolte RT, Wisely GB, McInerney EM, Rose DW, Milburn MV, Rosenfeld MG, Glass CK** 1998 Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. *Nature* 395:199-202
4. **Gervois P, Torra IP, Chinetti G, Grotzinger T, Dubois G, Fruchart JC, Fruchart-Najib J, Leitersdorf E, Staels B** 1999 A truncated human peroxisome proliferator-activated receptor alpha splice variant with dominant negative activity. *Mol Endocrinol* 13:1535-49
5. **Mukherjee R, Jow L, Noonan D, McDonnell DP** 1994 Human and rat peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 51:157-66
6. **Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H** 1997 Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 46:1319-27
7. **Huin C, Corriveau L, Bianchi A, Keller JM, Collet P, Kremarik-Bouillaud P, Domenjoud L, Becuwe P, Schohn H, Menard D, Dauca M** 2000 Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the developing human fetal digestive tract. *J Histochem Cytochem* 48:603-11
8. **Hanley K, Komuves LG, Ng DC, Schoonjans K, He SS, Lau P, Bikle DD, Williams ML, Elias PM, Auwerx J, Feingold KR** 2000 Farnesol stimulates differentiation in epidermal keratinocytes via PPARalpha. *J Biol Chem* 275:11484-91
9. **Zhou YT, Shimabukuro M, Wang MY, Lee Y, Higa M, Milburn JL, Newgard CB, Unger RH** 1998 Role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in disease of pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8898-903
10. **Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W** 1996 Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137:354-66
11. **Bordji K, Grillasca JP, Gouze JN, Magdalou J, Schohn H, Keller JM, Bianchi A, Dauca M, Netter P, Terlain B** 2000 Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *J Biol Chem* 275:12243-50
12. **Schultz R, Yan W, Toppari J, Volkl A, Gustafsson JA, Pelto-Huikko M** 1999 Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha messenger ribonucleic acid and protein in human and rat testis. *Endocrinology* 140:2968-75

13. **Komar CM, Curry TE, Jr.** 2002 Localization and expression of messenger RNAs for the peroxisome proliferator-activated receptors in ovarian tissue from naturally cycling and pseudopregnant rats. *Biol Reprod* 66:1531-9
14. **Palmer CN, Hsu MH, Griffin KJ, Raucy JL, Johnson EF** 1998 Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver. *Mol Pharmacol* 53:14-22
15. **Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutzky J** 1999 PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 99:3125-31
16. **Inoue I, Shino K, Noji S, Awata T, Katayama S** 1998 Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in primary cultures of human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 246:370-4
17. **Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A** 1998 Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 393:790-3
18. **Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B** 1998 Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 273:25573-80
19. **Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B** 2000 CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 101:2411-7
20. **Gervois P, Chopin-Delannoy S, Fadel A, Dubois G, Kosykh V, Fruchart JC, Najib J, Laudet V, Staels B** 1999 Fibrates increase human REV-ERBalpha expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol Endocrinol* 13:400-9
21. **Hsu MH, Palmer CN, Song W, Griffin KJ, Johnson EF** 1998 A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. *J Biol Chem* 273:27988-97
22. **A IJ, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B** 1997 Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* 272:20108-17
23. **DiRenzo J, Soderstrom M, Kurokawa R, Ogliastro MH, Ricote M, Ingrey S, Horlein A, Rosenfeld MG, Glass CK** 1997 Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol Cell Biol* 17:2166-76
24. **Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B** 1999 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 274:32048-54
25. **Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B** 1999 Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 85:394-402

26. **Poynter ME, Daynes RA** 1998 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem* 273:32833-41
27. **Gervois P, Vu-Dac N, Kleemann R, Kockx M, Dubois G, Laine B, Kosykh V, Fruchart JC, Kooistra T, Staels B** 2001 Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem* 276:33471-7
28. **Delerive P, Furman C, Teissier E, Fruchart J, Duriez P, Staels B** 2000 Oxidized phospholipids activate PPARalpha in a phospholipase A2-dependent manner. *FEBS Lett* 471:34-8
29. **Delerive P, De Bosscher K, Vanden Berghe W, Fruchart JC, Haegeman G, Staels B** 2002 DNA binding-independent induction of IkappaBalpha gene transcription by PPARalpha. *Mol Endocrinol* 16:1029-39
30. **Wang MY, Lee Y, Unger RH** 1999 Novel form of lipolysis induced by leptin. *J Biol Chem* 274:17541-4
31. **Steineger HH, Sorensen HN, Tugwood JD, Skrede S, Spydevold O, Gautvik KM** 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* 225:967-74
32. **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* 269:24527-30
33. **Lemberger T, Braissant O, Juge-Aubry C, Keller H, Saladin R, Staels B, Auwerx J, Burger AG, Meier CA, Wahli W** 1996 PPAR tissue distribution and interactions with other hormone-signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci* 804:231-51
34. **Guardiola-Diaz HM, Rehnmark S, Usuda N, Albrektsen T, Feltkamp D, Gustafsson JA, Alexson SE** 1999 Rat peroxisome proliferator-activated receptors and brown adipose tissue function during cold acclimatization. *J Biol Chem* 274:23368-77
35. **Roduit R, Morin J, Masse F, Segall L, Roche E, Newgard CB, Assimacopoulos-Jeannet F, Prentki M** 2000 Glucose down-regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene in the pancreatic beta -cell. *J Biol Chem* 275:35799-806
36. **Lemberger T, Saladin R, Vazquez M, Assimacopoulos F, Staels B, Desvergne B, Wahli W, Auwerx J** 1996 Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J Biol Chem* 271:1764-9
37. **Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W** 1999 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103:1489-98
38. **Pineda Torra I, Claudel T, Duval C, Kosykh V, Fruchart JC, Staels B** 2003 Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene via activation of the farnesoid X receptor. *Mol Endocrinol* 17:259-72
40. **Jalouli M, Carlsson L, Ameen C, Linden D, Ljungberg A, Michalik L, Eden S, Wahli W, Oscarsson J** 2003 Sex difference in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression: influence of pituitary and gonadal hormones. *Endocrinology* 144:101-9

41. **Shalev A, Siegrist-Kaiser CA, Yen PM, Wahli W, Burger AG, Chin WW, Meier CA** 1996 The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology* 137:4499-502
42. **Barger PM, Brandt JM, Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP** 2000 Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth. *J Clin Invest* 105:1723-30
43. **Barger PM, Browning AC, Garner AN, Kelly DP** 2001 p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha: a potential role in the cardiac metabolic stress response. *J Biol Chem* 276:44495-501
44. **Lazennec G, Canaple L, Saugy D, Wahli W** 2000 Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol Endocrinol* 14:1962-75
45. **Blanquart C, Mansouri R, Paumelle R, Fruchart JC, Staels B, Glineur C** 2004 The protein kinase C signaling pathway regulates a molecular switch between transactivation and transrepression activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Mol Endocrinol* 18:1906-18
46. **Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C** 2002 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes. *J Biol Chem* 277:37254-9
47. **Mukherjee R, Sun S, Santomena L, Miao B, Walton H, Liao B, Locke K, Zhang JH, Nguyen SH, Zhang LT, Murphy K, Ross HO, Xia MX, Teleha C, Chen SY, Selling B, Wynn R, Burn T, Young PR** 2002 Ligand and coactivator recruitment preferences of peroxisome proliferator activated receptor alpha. *J Steroid Biochem Mol Biol* 81:217-25
48. **Blanquart C, Mansouri R, Fruchart JC, Staels B, Glineur C** 2004 Different ways to regulate the PPARalpha stability. *Biochem Biophys Res Commun* 319:663-70
49. **Pineda Torra I, Jamshidi Y, Flavell DM, Fruchart JC, Staels B** 2002 Characterization of the human PPARalpha promoter: identification of a functional nuclear receptor response element. *Mol Endocrinol* 16:1013-28
50. **Fu J, Oveisi F, Gaetani S, Lin E, Piomelli D** 2005 Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR-alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology* 48:1147-53
51. **Forman BM, Chen J, Evans RM** 1997 Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4312-7
52. **Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM** 1997 Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4318-23
53. **Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W** 1997 Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 11:779-91
54. **Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W** 1996 The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384:39-43
56. **Brown PJ, Stuart LW, Hurley KP, Lewis MC, Winegar DA, Wilson JG, Wilkison WO, Ittoop OR, Willson TM** 2001 Identification of a subtype selective human PPARalpha agonist through parallel-array synthesis. *Bioorg Med Chem Lett* 11:1225-7

57. **Brown PJ, Winegar DA, Plunket KD, Moore LB, Lewis MC, Wilson JG, Sundseth SS, Koble CS, Wu Z, Chapman JM, Lehmann JM, Kliewer SA, Willson TM** 1999 A ureido-thioisobutyric acid (GW9578) is a subtype-selective PPARalpha agonist with potent lipid-lowering activity. *J Med Chem* 42:3785-8
58. **Frohnert BI, Hui TY, Bernlohr DA** 1999 Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *J Biol Chem* 274:3970-7
59. **Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J** 1997 Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem* 272:28210-7
60. **Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, Auwerx J** 1995 Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem* 270:19269-76
61. **Brandt JM, Djouadi F, Kelly DP** 1998 Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 273:23786-92
62. **Guerre-Millo M, Gervois P, Raspe E, Madsen L, Poulain P, Derudas B, Herbert JM, Winegar DA, Willson TM, Fruchart JC, Berge RK, Staels B** 2000 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J Biol Chem* 275:16638-42
63. **Mascaro C, Acosta E, Ortiz JA, Marrero PF, Hegardt FG, Haro D** 1998 Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 273:8560-3
64. **Minnich A, Tian N, Byan L, Bilder G** 2001 A potent PPARalpha agonist stimulates mitochondrial fatty acid beta-oxidation in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E270-9
65. **Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ, Staels B, van Bilsen M** 2003 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res* 92:518-24
66. **Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, Gonzalez FJ** 1998 Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem* 273:5678-84
67. **Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, Kelly DP** 1994 The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11012-6
68. **Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H, Gonzalez FJ** 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* 15:3012-22
69. **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* 68:879-87

70. **Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, 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* 11:433-9
71. **Le May C, Pineau T, Bigot K, Kohl C, Girard J, Pegorier JP** 2000 Reduced hepatic fatty acid oxidation in fasting PPARalpha null mice is due to impaired mitochondrial hydroxymethylglutaryl-CoA synthase gene expression. *FEBS Lett* 475:163-6
72. **Muerhoff AS, Griffin KJ, Johnson EF** 1992 The peroxisome proliferator-activated receptor mediates the induction of CYP4A6, a cytochrome P450 fatty acid omega-hydroxylase, by clofibric acid. *J Biol Chem* 267:19051-3
73. **Johnson EF, Palmer CN, Griffin KJ, Hsu MH** 1996 Role of the peroxisome proliferator-activated receptor in cytochrome P450 4A gene regulation. *Faseb J* 10:1241-8
74. **Kroetz DL, Yook P, Costet P, Bianchi P, Pineau T** 1998 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls the hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes. *J Biol Chem* 273:31581-9
75. **Huang B, Wu P, Bowker-Kinley MM, Harris RA** 2002 Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligands, glucocorticoids, and insulin. *Diabetes* 51:276-83
76. **Wu P, Peters JM, Harris RA** 2001 Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 287:391-6
77. **Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP** 1999 A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7473-8
78. **Bandsma RH, Van Dijk TH, Harmsel At A, Kok T, Reijngoud DJ, Staels B, Kuipers F** 2004 Hepatic de novo synthesis of glucose 6-phosphate is not affected in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice but is preferentially directed toward hepatic glycogen stores after a short term fast. *J Biol Chem* 279:8930-7
79. **Knauf C, Rieusset J, Foretz M, Cani PD, Uldry M, Hosokawa M, Martinez E, Bringart M, Waget A, Kersten S, Desvergne B, Gremlich S, Wahli W, Seydoux J, Delzenne NM, Thorens B, Burcelin R** 2006 Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null mice have increased white adipose tissue glucose utilization, GLUT4, and fat mass: Role in liver and brain. *Endocrinology* 147:4067-78
80. **Linden D, Lindberg K, Oscarsson J, Claesson C, Asp L, Li L, Gustafsson M, Boren J, Olofsson SO** 2002 Influence of peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists on the intracellular turnover and secretion of apolipoprotein (Apo) B-100 and ApoB-48. *J Biol Chem* 277:23044-53
81. **Vu-Dac N, Gervois P, Jakel H, Nowak M, Bauge E, Dehondt H, Staels B, Pennacchio LA, Rubin EM, Fruchart-Najib J, Fruchart JC** 2003 Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators. *J Biol Chem* 278:17982-5
82. **Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J** 1996 PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J* 15:5336-48

83. **Staels B, Vu-Dac N, Kosykh VA, Saladin R, Fruchart JC, 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* 95:705-12
84. **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* 270:13470-5
85. **Vu-Dac N, Chopin-Delannoy S, Gervois P, Bonnelye E, Martin G, Fruchart JC, Laudet V, Staels B** 1998 The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J Biol Chem* 273:25713-20
86. **Vu-Dac N, Schoonjans K, Laine B, Fruchart JC, 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* 269:31012-8
87. **Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B, Auwerx J** 1995 Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest* 96:741-50
88. **Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C, Gonzalez FJ, Auwerx J** 1997 Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Biol Chem* 272:27307-12
89. **Berthou L, Duverger N, Emmanuel F, Langouet S, Auwerx J, Guillouzo A, Fruchart JC, Rubin E, Deneffe P, Staels B, Branellec D** 1996 Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. *J Clin Invest* 97:2408-16
90. **Staels B, Peinado-Onsurbe J, Auwerx J** 1992 Down-regulation of hepatic lipase gene expression and activity by fenofibrate. *Biochim Biophys Acta* 1123:227-30
91. **Staels B, van Tol A, Skretting G, Auwerx J** 1992 Lecithin:cholesterol acyltransferase gene expression is regulated in a tissue-selective manner by fibrates. *J Lipid Res* 33:727-35
92. **Bouly M, Masson D, Gross B, Jiang XC, Fievet C, Castro G, Tall AR, Fruchart JC, Staels B, Lagrost L, Luc G** 2001 Induction of the phospholipid transfer protein gene accounts for the high density lipoprotein enlargement in mice treated with fenofibrate. *J Biol Chem* 276:25841-7
93. **Mardones P, Pilon A, Bouly M, Duran D, Nishimoto T, Arai H, Kozarsky KF, Altayo M, Miquel JF, Luc G, Clavey V, Staels B, Rigotti A** 2003 Fibrates down-regulate hepatic scavenger receptor class B type I protein expression in mice. *J Biol Chem* 278:7884-90
94. **Miller NE, Miller GJ** 1975 Letter: High-density lipoprotein and atherosclerosis. *Lancet* 1:1033
95. **Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart JC, Clavey V, Staels B** 2001 PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 7:53-8
96. **Chinetti G, Lestavel S, Fruchart JC, Clavey V, Staels B** 2003 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha reduces cholesterol esterification in macrophages. *Circ Res* 92:212-7
97. **Campbell FM, Kozak R, Wagner A, Altarejos JY, Dyck JR, Belke DD, Severson DL, Kelly DP, Lopaschuk GD** 2002 A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose

- oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. *J Biol Chem* 277:4098-103
98. **Delerive P, Fruchart JC, Staels B** 2001 Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* 169:453-9
 99. **Baumann H, Gauldie J** 1994 The acute phase response. *Immunol Today* 15:74-80
 100. **Kleemann R, Gervois PP, Verschuren L, Staels B, Princen HM, Kooistra T** 2003 Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation. *Blood* 101:545-51
 101. **Gervois P, Fruchart JC, Staels B** 2007 Drug Insight: mechanisms of action and therapeutic applications for agonists of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3:145-56
 102. **Zambon A, Gervois P, Pauletto P, Fruchart JC, Staels B** 2006 Modulation of hepatic inflammatory risk markers of cardiovascular diseases by PPAR-alpha activators: clinical and experimental evidence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:977-86
 103. **Gervois P, Kleemann R, Pilon A, Percevault F, Koenig W, Staels B, Kooistra T** 2004 Global suppression of IL-6-induced acute phase response gene expression after chronic in vivo treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate. *J Biol Chem* 279:16154-60
 104. **Pourcet B, Fruchart JC, Staels B, Glineur C** 2006 Selective PPAR modulators, dual and pan PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Expert Opin Emerg Drugs* 11:379-401
 105. **Jacobson TA, Miller M, Schaefer EJ** 2007 Hypertriglyceridemia and cardiovascular risk reduction. *Clin Ther* 29:763-77
 106. **Avogaro P, Ghiselli G, Soldan S, Bittolo Bon G** 1992 Relationship of triglycerides and HDL cholesterol in hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 92:79-86
 107. **Frick MH, Syvanne M, Nieminen MS, Kauma H, Majahalme S, Virtanen V, Kesaniemi YA, Pasternack A, Taskinen MR** 1997 Prevention of the angiographic progression of coronary and vein-graft atherosclerosis by gemfibrozil after coronary bypass surgery in men with low levels of HDL cholesterol. Lipid Coronary Angiography Trial (LOCAT) Study Group. *Circulation* 96:2137-43
 108. **Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J** 1999 Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 341:410-8
 109. 2001 Effect of fenofibrate on progression of coronary-artery disease in type 2 diabetes: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study, a randomised study. *Lancet* 357:905-10
 110. **Ericsson CG, Hamsten A, Nilsson J, Grip L, Svane B, de Faire U** 1996 Angiographic assessment of effects of bezafibrate on progression of coronary artery disease in young male postinfarction patients. *Lancet* 347:849-53
 111. **Tordjman K, Bernal-Mizrachi C, Zemany L, Weng S, Feng C, Zhang F, Leone TC, Coleman T, Kelly DP, Semenkovich CF** 2001 PPARalpha deficiency reduces insulin resistance and atherosclerosis in apoE-null mice. *J Clin Invest* 107:1025-34

Annexe 1 Molécules utilisées dans le traitement des dyslipidémies

Les statines

Celles-ci sont utilisées dans le traitement des hypercholestérolémies. Ce sont des inhibiteurs de l'HMG-CoA reductase, enzyme assurant la transformation du HMG-CoA en acide mévalonique (précurseur de la synthèse endogène du cholestérol). Elles induisent une augmentation des récepteurs hépatiques aux LDL et donc réduisent les concentrations plasmatiques de LDL-Cholestérol (LDL-C) de 20 à 50 %.

Les statines utilisées en France sont la simvastatine, la pravastatine, la fluvastatine, l'atorvastatine et la rosuvastatine.

Simvastatine	ZOCOR®, Comprimés à 20 et 40 mg
Pravastatine	VASTEN® Comprimés à 10, 20 et 40 mg ELISOR® Comprimés à 10, 20 et 40 mg
Fluvastatine	LESCOL® Comprimés à 20, 40 et 80 mg FRACTAL® Comprimés à 20, 40 et 80 mg
Atorvastatine	TAHOR® Comprimés à 10, 20, 40 et 80 mg
Rosuvastatine	CRESTOR®, Comprimés à 5, 10 et 20 mg

Ont ensuite une place plus limitée dans la prise en charge des dyslipidémies :

✓ Les résines échangeuses d'anions : Le principal médicament de cette classe est la cholestyramine. Administrée sous forme de chlorure, elle échange les anions chlorure contre d'autres anions, principalement les acides biliaires. Ainsi, au niveau intestinal, en séquestrant les acides biliaires, elle diminue leur cycle entéro-hépatique et leur pool hépatique, ce qui favorise la transformation du cholestérol en acides biliaires. L'augmentation du catabolisme du cholestérol entraîne une augmentation des récepteurs hépatiques aux LDL et donc une diminution du cholestérol-LDL de 20 %. L'association cholestyramine et d'une statine (inhibiteur de

l'HMG-CoA réductase) est d'une très grande efficacité pour faire chuter le cholestérol en cas d'hypercholestérolémie majeure.

Cholestyramine	QUESTRAN® Sachets 4 g
----------------	-----------------------

✓ L'acide nicotinique: Indiqué dans le traitement des dyslipidémies mixtes ou en cas d'hypercholestérolémie primaire, en général en association avec une statine. Cependant, il peut être utilisé en monothérapie en cas d'intolérance aux statines. L'acide nicotinique diminue les taux plasmatiques de VLDL et de LDL chez les patients hyperlipidémiques par diminution de la sécrétion des VLDL.

L'acide nicotinique, connu depuis plus de 50 ans, a été utilisé en thérapeutique, à faible dose de l'ordre du 1 mg comme vasodilatateur et à fortes doses, de l'ordre du gramme, comme hypolipémiant ; il possède de plus des propriétés de type vitamine PP après sa transformation dans l'organisme en nicotinamide qui théoriquement ne donne pas de vasodilatation.

L'acide nicotinique a des effets bénéfiques sur les lipides sanguins : il abaisse le LDL-cholestérol, augmente le HDL-cholestérol, diminue Lp(a), abaisse les triglycérides, par des mécanismes complexes. Cependant aucune étude clinique ne semble avoir démontré que l'acide nicotinique diminuait le risque d'accidents cardiovasculaires ni la mortalité toutes causes confondues.

La commercialisation de l'acide nicotinique (préparations à libération non retardée) a été interrompue pendant plusieurs années en France ; une préparation à libération prolongée, Niaspan LP*, a été commercialisée. Cette libération prolongée diminue l'intensité des bouffées de chaleur communément observée avec l'acide nicotinique mais ne réduit pas ses autres effets indésirables : dyspepsie, nausées, vomissements, diarrhée, hépatotoxicité, aggravation du diabète, troubles oculaires : amblyopie toxique et oedème maculaire ... Par ailleurs, l'association d'acide nicotinique à une statine semble augmenter le risque d'atteinte musculaire et de rhabdomyolyse. La vasodilatation provoquée par l'acide nicotinique résulterait de la stimulation des récepteurs PD2 de la prostaglandine PGD2. Le laropiprant est un produit de synthèse en cours d'expérimentation qui inhibe les récepteurs PD2 et diminue ainsi les flushs provoqués par l'acide nicotinique.

Acide Nicotinique	NIASPAN® LP, Cp à 375, 500, 750 et 1000 mg
-------------------	--------------------------------------------

✓ Les Inhibiteurs de l'absorption intestinale du cholestérol, stérols végétaux et ézétimibe

Les stérols et stanols d'origine végétale comme le sitostérol et le sitostanol réduisent l'absorption intestinale de cholestérol et abaissent le LDL-cholestérol plasmatique. Leur effet apparaît d'autant plus important que l'apport alimentaire de cholestérol est élevé. Le sitostanol, présent par exemple dans l'huile de soja, qui lui-même n'est pratiquement pas absorbé est le plus efficace. Cependant il n'existe pas, semble-t-il, d'études démontrant leur efficacité sur la symptomatologie clinique ni sur la mortalité.

Diverses préparations alimentaires, notamment à base de lait écrémé, sont enrichies en stérols végétaux en vue d'abaisser le taux de cholestérol.

✓ L'ézétimibe :

Cette molécule de synthèse inhibe sélectivement l'absorption intestinale de cholestérol et de certains phytostérols. Il inhibe le transporteur de stérols. Il agit au niveau de la muqueuse intestinale mais il est lui-même absorbé et partiellement transformé en un métabolite actif glycuronoconjugué, l'ézétimibe-glycuronide. Lors des essais cliniques de courte durée, l'ézétimibe a abaissé de près de 20 % la concentration de LDL cholestérol plasmatique.

L'indication de l'ézétimibe, en complément d'une statine, est l'hypercholestérolémie. Seul, sans statine, il a l'indication sitostérolémie, maladie rare due à une absorption intestinale excessive et à une élimination insuffisante de sitostérol, stérol d'origine végétale.

Ezétimibe	EZETROL®, Cp à 10 mg
Ezétimibe + Simvastatine	INEGY®

Les études cliniques n'ont pas pour le moment permis de prouver que l'ézétimibe réduit la fréquence des accidents cardiovasculaires ni qu'il retarde la mortalité toutes causes confondues. Elles ne garantissent pas non plus sa bonne tolérance en utilisation prolongée.

✓ Les acides gras oméga-3

L'apport d'acides gras saturés, c'est-à-dire de graisses d'origine animale comme le beurre et le lard, ou d'acide gras insaturés de type *trans*, présents dans certaines

margarines, tend à augmenter les LDL considérées comme néfastes et à diminuer les HDL considérées comme bénéfiques. Toutefois l'acide stéarique (C18 : 0, saturé) est peu hypercholestérolémiant car il est rapidement transformé en acide oléique (C18 :1), monoinsaturé) par le foie. L'acide palmitique (C16 :0) est peu hypercholestérolémiant ; les acides myristique (C14 :0) et laurique (C12) le sont davantage.

Parmi les acides gras insaturés de type *cis*, l'acide oléique (C18 :1) présent dans les huiles végétales, réduit les LDL et augmente les HDL. L'acide linoléique (C18 :2) est moins approprié car il est plus facilement peroxydé par les réactions radicalaires. Les acides gras polyinsaturés de type ω 3 comme l'acide eicosapentaénoïque, EPA, (C20 :5) et l'acide docohexaénoïque, DHA, (C22 :6), présents dans les poissons des mers froides, inhibent l'agrégation plaquettaire mais ont assez peu d'effet sur le cholestérol. L'enrichissement du régime alimentaire en acides gras insaturés *n*-3 diminue le risque de troubles du rythme cardiaque, d'accidents coronariens et de mort subite. Une solution simple pour enrichir modérément l'alimentation en acide oléique est la consommation d'olives, d'avocats, d'huile d'arachide ou de noix, riches en acides gras insaturés, arginine et magnésium.

✓ Le tiadéno

Il a une structure chimique différente de celle des autres hypolipémiants. Il abaisse les lipides sanguins par des mécanismes complexes et mal élucidés, probablement une diminution de la synthèse de cholestérol par inhibition des premières étapes avant le mévalonate. Jusqu'à présent, peu d'effets indésirables ont été signalés lors de sa prescription.

Tiadéno	FONLIPOL® Cp 400 mg
---------	---------------------

✓ Les associations