



**HAL**  
open science

# Etude du lien entre la MASLD et l'athérosclérose : implication du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$

Doriane Henry

► **To cite this version:**

Doriane Henry. Etude du lien entre la MASLD et l'athérosclérose : implication du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ . Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2024. Français. NNT : 2024ULILS053 . tel-04917083

**HAL Id: tel-04917083**

**<https://theses.hal.science/tel-04917083v1>**

Submitted on 28 Jan 2025

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**UNIVERSITE DE LILLE**

**École Doctorale Biologie-Santé (n°446)**

## **THESE**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

**Discipline : Sciences biologiques, fondamentales et cliniques**

Présentée et soutenue publiquement par

**Doriane Henry**

Le 06 décembre 2024

**Etude du lien entre la MASLD et l'athérosclérose :  
implication du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$**

Dirigée par le Dr. Fanny Lalloyer

Jury :

Dr. Maryse Guerin (INSERM UMRS 1166)

Rapportrice

Pr. Bertrand Cariou (INSERM UMR 1087/CNRS UMR 6291)

Rapporteur

Pr. Karolien de Bosscher (VIB Center for Medical Biotechnology)

Examinatrice

Pr. Bart Staels (INSERM UMR 1011)

Président

Dr. Fanny Lalloyer (INSERM UMR 1011)

Directrice de thèse





**REMERCIEMENTS**



Tout d'abord, je tiens à exprimer mes remerciements au professeur Bart Staels pour m'avoir accueillie et permis de réaliser ma thèse au sein de l'UMR1011. Vous m'avez guidée au cours de ces quatre années et je suis très reconnaissante d'avoir pu bénéficier de vos conseils, de vos connaissances, de votre rigueur et de votre regard critique, merci. Vous m'avez encouragée à participer au concours de l'école doctorale à un moment où tout semblait difficile, et je vous en remercie, car vous aviez raison : je l'aurais regretté.

Je remercie grandement le Dr. Maryse Guerin, le Pr. Bertrand Cariou et le Pr. Karolien de Bosscher pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse afin de juger mes travaux. Soyez assurés de ma plus grande considération pour l'investissement que vous avez donné dans la lecture de mon projet.

Merci également à l'Institut Européen de Génomique pour le Diabète (EGID) et à la Fondation de France qui ont permis de financer mes travaux de thèse.

J'adresse également tout ma reconnaissance à ma directrice de thèse, le docteur Fanny Lalloyer, pour m'avoir intégrée au sein de son équipe et pour la confiance qu'elle m'a accordée au cours de ces quatre années, mais également lors de mes stages de Master à l'origine de cette belle expérience ! Je ne compte plus les litres de larme que j'ai pu déverser dans notre bureau mais vous avez toujours fait preuve de patience et de bienveillance pour me rassurer et me montrer que la montagne devant laquelle je me trouvais n'était finalement pas si haute. Grâce à vous, j'ai pu accomplir des choses que je n'aurais jamais cru possibles il y a quatre ans. Encore une fois, merci et je ne dirais plus qu'une chose... Tout ça mérite bien une grosse boîte de chocolat !!

Un immense merci à Éric pour sa présence quotidienne et pour toutes les réponses qu'il m'a apportées, qu'elles concernent mes questions scientifiques ou mes réflexions sur mon avenir professionnel. Merci également d'avoir veillé sur ma ligne et mon régime de sportive en partageant avec moi les groseilles, pommes et autres fruits de votre jardin ! Je garderai aussi en mémoire vos petites blagues, toujours aussi originales et parfaitement bien placées.

Nathalie... ma maman de 8h à 18h... notre maman à tous finalement ! Je n'aurai jamais assez de mots pour te dire à quel point tu as été un soutien précieux pendant ces dernières années. Du plus profond de mon cœur, je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée sur la science (argggg ces western-blot !!!), pour le soutien moral que tu as été, et évidemment... pour avoir régalié hebdomadairement nos estomacs de mets tous plus délicieux les uns que les autres ! Rien ne pourra jamais égaler toute la bonté et la bienveillance dont tu fais preuve quotidiennement. Je suis très fière d'avoir appris les mots fléchés avec toi, la reine des cruciverbistes. Grâce à toi, les forces 3-4 n'ont désormais plus de secrets pour nous... En tout cas, une chose est sûre c'est que tu n'auras pas le « seum » de me voir partir puisque je reste avec vous encore quelques mois ! Et attention si tu pleures, je pleure !!

Audrey (la grande), je suis tellement reconnaissante d'avoir pu partager de si bons moments avec toi la grande doctorante qui était dans le bureau d'à côté et m'intimidait ! Tu es partie et m'a laissée une grosse responsabilité : m'occuper de Viktor... mais je crois que la mission a été réussie, tu peux être rassurée ! Merci pour tous tes conseils, pour ton soutien et pour tous ces goûters à la Wilderie (ou ailleurs mais surtout à la Wilderie, il faudra peut-être qu'on pense à demander une carte de fidélité...). J'espère qu'on aura l'occasion de les éliminer lors d'un footing à deux !

Dans ma lancée « running », je remercie bien évidemment Audrey (la petite, pas la grande cette fois). Je me souviendrai toujours de ta compagnie sur notre premier semi-marathon, on ne s'est pas lâchée du premier au dernier km (on se souviendra de la petite baisse de régime autour du 18<sup>ème</sup>...) et ça c'était une vraiment belle expérience ! Merci pour l'accueil que tu m'as fait dans la sphère aquatique et tes encouragements pour me faire sentir comme un poisson dans l'eau malgré mes « je sais pas nager !!! j'arrive pas à respirer quand je nage le crawl !!! ». Bien évidemment, nous sommes de très grandes sportives mais je retiendrai également toutes nos sorties (peut-être un peu trop nombreuses parfois) à St-So (toujours en bonne compagnie de Quentin, Cecici et parfois Margaux) qui ont toujours été très rocambolesques. Je suis très fière d'avoir upgrade dans ton cœur mon statut de collègue à amie puisque j'ai eu le privilège de faire des soirées chez toi, même si je n'avais pas été invitée à cette fameuse crémaillère (les autres sont jaloux c'est sûr).

Je remercie également tous mes collègues de la team LivAdip (LivAdip + Dori hihi) qui m'ont adoptée (Joel l'a dit lui-même on ne peut plus revenir en arrière) et épaulée quotidiennement pendant ces 4 années. Tout d'abord un grand merci à Joel pour son aide et son expérience pour les analyses de single-nuclei. J'espère que tu as bien dégusté et apprécié la super bière de Noël à ton effigie ! Merci à Pauline, la cheffe ARN également possesseuse d'un GROS chat, pour sa gentillesse sans fin, son sourire permanent qui a égayé mes journées au labo et ce magnifique origami Hello Kitty que je garderai à vie (je te le promets !). J'espère qu'on aura l'occasion de partager d'autres « brunch cat » et d'autres festivals en tout genre. Je remercie également Kevin (alias Keke pour les intimes) pour sa précieuse aide lors des manip de single nuclei ! Merci pour toutes ces soirées roof-top où ton accueil a toujours été exemplaire, tu nous as ré-ga-lé ! Peut-être que finalement je ne déteste pas tant que ça les bretons même si tu m'as fait peur de nombreuses fois en arrivant à pas de loup alors que j'avais le dos tourné ! Merci à Ghanini (ou Siffli, ça dépend l'état de ses poumons), Anne-So (et ses nombreux Reels ou TikTok toujours très inspirants), Camilla (et tous les plats libanais qu'elle nous a partagé), Arthur (et sa super technique de défense), Khamis (et toutes ses histoires qui ont animé nos déjeuners), Emilie, Marine (et son accent toulousain fraîchement arrivé qui adoucit nos oreilles), Lucas et Delphine (et son super grand écart) pour tous ces bons moments au quotidien, ces restaurants et pour tout le soutien que vous m'avez apportée.

Un grand merci également à ma Cecici qui a toujours été partante pour me suivre et m'accompagner dans toutes ces randonnées peu importe l'état de la météo (sous le vent, la pluie ou le soleil) ! Merci pour tous ces souvenirs en congrès à Biarritz ou à Mannheim : mention spéciale au tricycle qui nous a voulu un bon gros fou rire avec Valentine ainsi qu'à la doublure de la robe verte de Lise ! Évidemment, tu as toujours été partante pour les randonnées mais également pour les soirées avec Audrey, Quentin et Margaux qui aujourd'hui nous coûtent seulement de nombreux bons souvenirs. D'ailleurs, Quentin, il y a bien longtemps que je n'ai pas entendu « Doriiiiiiii » dans le couloir du 4<sup>ème</sup> étage au petit matin ou ton jugement sur ma paire de chaussures quand ce n'est pas une paire de Air Jordan (désolé mais pas de Air Jordan le jour de ma soutenance quand même...), et je dois avouer que ça me

manque un peu... A vous, merci pour tous ces moments de rire, de joie et de décompression bien mérités.

J'aimerais également remercier toutes les personnes qui m'ont précieusement aidée à finaliser cette thèse et plus particulièrement Bruno et ses connaissances infinies en qPCR, Manue et son super automate le KoneLab, Sébastien pour son aide en histologie et Sandrine pour le ProCyte ! Merci à Marie-Hélène, Marie-Christine et Caroline pour leur sourire permanent même face aux éventuelles difficultés administratives !!

Durant ces années de thèse, j'ai eu la chance d'enrichir mon parcours de recherche avec une expérience d'enseignement, et pour cela, je tiens à remercier chaleureusement Anne et Thierry pour leur confiance et leur accueil au sein du service de Biochimie, d'abord en tant que monitrice, puis plus récemment en tant qu'ATER. Grâce à la bienveillance de Yasmine et à l'humour de Benoît, j'ai pu me découvrir une véritable passion pour l'enseignement. J'ai hâte de poursuivre et d'approfondir cette nouvelle aventure dans l'année à venir !

Lise (ou Lisouille ou Lisounette), Charlène, Margaux, Yasmine, Benoit, Emilie potins, Ainhoa, Valentine, Stéphane, Christian, Aurore, Marion, Bettina, Laurent, Vance, Samuel, Emily, Pelin, Marie-Laure mais également mes petits stagiaires et plus particulièrement Elysa et Chloé qui m'ont encore plus donné envie de transmettre mes connaissances, nos collègues de JK (plus communément appelés les JKettes), Cyril, Lucie, Ludivine, Hugo, Arthur, Christina, Chloé, Mickaël, Johan, Claire, Simon, merci à vous tous, membres ou ex-membres de l'UMR1011 que j'ai pu croiser au cours de ce doctorat, pour toutes ces discussions scientifiques, ces bons moments du quotidien au labo ou en dehors... J'adresse également une pensée pour Isabelle qui m'a probablement apportée le plus beau (et le plus gros) cadeau de ces années de thèse : mon chat, mon coloc, Sushi qui partage ma vie depuis 3 ans maintenant. Je suis désolée pour tout le stress que ma présence a pu lui causer, ce qui l'a malheureusement rendu malade...pardon mon Sushito.

Le meilleur pour la fin comme il aime si bien le dire, je ne pourrai écrire ces remerciements sans mentionner mon bras droit dans cette expérience : Viktor. D'un inconnu

dans le couloir des étudiants, jusqu'au maître cordon bleu, puis au maître présentisme et enfin à un ami et je dirais même un grand frère (BAGARRE !!!) dans nos bureaux de thésard respectifs (ou jusqu'au sommet de l'araignée du parc JB Lebas), je ne te remercierai jamais assez pour le pilier que tu as été et toute la force que tu m'as apportée ces dernières années. Grâce à toi, je ne suis plus « Doriane » mais « Dori ». En fait, tous ces bons moments c'est grâce à toi. La bienveillance et l'altruisme dont tu fais preuve 7j/7 24h/24 est un vrai exemple et j'espère que jamais rien ne te fera perdre ces qualités. Merci d'avoir rempli mes journées avec ta bonne humeur qui ne s'épuise jamais, tes chansons toutes les unes plus entêtantes que les autres (j'suis content c'est le printemps ou capybaraaaa) et d'avoir toujours été là même dans les journées où mon « aigritude » était à son apogée. Tu as été un grand frère mais aussi un parent avec Cam quand vous m'emmenez en week-end à la plage par exemple hihi. J'espère pouvoir profiter encore un petit moment de tes arrivées dans mon bureau pour se raconter nos petits secrets. Je sais que tu as arrêté la course à pied parce que je suis plus forte que toi mais t'inquiètes pas j'ai quand même très hâte de monter notre équipe de Spike Ball... Je crois qu'il est venu le temps de l'avouer... tu es officiellement un catalyseur de bonne humeur.

Cette thèse, je la dois aussi à ma famille, mes parents et ma petite sœur Maelle. Vous m'avez donné la chance d'étudier dans l'une des plus belles villes de France, un endroit où j'ai pu m'épanouir, grandir et devenir la personne que je suis aujourd'hui et je vous en serai éternellement reconnaissante. Votre confiance inébranlable et votre soutien constant, même lorsque cette aventure n'était pas toujours facile à comprendre, ont été essentiels pour la finaliser. Merci infiniment d'être les personnes formidables que vous êtes. Je vous aime.

Je remercie également tous mes amis et plus particulièrement, ma Lulu et mon Pedro qui m'accompagnent depuis 15 ans maintenant dans cette belle aventure qu'est la vie et qui ont toujours fait preuve d'un soutien sans faille. Bravo pour votre effort à apprendre le titre de cette thèse par cœur mais dommage, un terme à changer, il va falloir recommencer (la maladie du foie gras non-alcoolique c'était plus facile pour vous hein...alcoolique...) ! Un énoooooorme merci à ma Jujuliane, ma Jujuliette, le Guigz, Jeannot, Alex, Quentin, Marg pour leur présence quotidienne... Merci pour tous ces souvenirs, tous ces voyages, toutes ces soirées, tous ces festivals, tous ces concerts, tous ces runs, toutes ces sessions escalades, tous ces shooters

Madeleine qui m'ont permis de faire une pause et décompresser dans ce train-train de doctorant ! Je remercie également mes super copines et copains du hand qui se reconnaîtront pour tous ces bons moments à l'entraînement, en week-end de cohésion, en match, dans le bus pendant nos déplacements ou encore une fois... au bar...

Je m'excuse sincèrement si par mégarde j'ai omis de mentionner certains collègues, amis ou connaissances qui ont contribué à cette aventure et je leur témoigne toute ma reconnaissance. En dehors ou au dedans des murs du laboratoire et des grilles vertes de Pasteur, de près ou de loin, vous avez tous participé à ces 4 années de doctorat et fait en sorte qu'elles se passent de la meilleure des façons possibles !

# TABLE DES MATIERES

<b>RESUME .....</b>	<b>14</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>16</b>
<b>COMMUNICATIONS.....</b>	<b>18</b>
<i>COMMUNICATIONS INTERNATIONALES .....</i>	<i>19</i>
<i>COMMUNICATIONS NATIONALES.....</i>	<i>20</i>
<i>RESUMES DE CONGRES PUBLIES .....</i>	<i>21</i>
<b>ABBREVIATIONS .....</b>	<b>22</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>26</b>
<i>PARTIE 1 : LE FOIE.....</i>	<i>28</i>
I. Structure du foie .....	28
II. Les fonctions métaboliques du foie .....	29
<i>PARTIE 2 : LES LIPOPROTEINES .....</i>	<i>34</i>
I. Généralités .....	34
II. Métabolisme des lipoprotéines .....	35
<i>PARTIE 3 : LA MALADIE DU FOIE STÉATOSIQUE ASSOCIÉE À UN DYSFONCTIONNEMENT MÉTABOLIQUE (MASLD)</i> <i>.....</i>	<i>40</i>
I. Définition .....	40
II. Facteurs de risque .....	42
III. Mécanismes physiopathologiques .....	42
IV. Diagnostic de la MASLD .....	47
V. Traitements de la MASLD .....	56
<i>PARTIE 4 : L'ATHÉROSCLÉROSE.....</i>	<i>64</i>
I. Généralités .....	64
II. Formation de la lésion d'athérosclérose .....	66
III. Facteurs de risque de l'athérosclérose.....	68
IV. Prise en charge.....	69
V. La MASLD : un nouveau facteur de risque pour l'athérosclérose ?.....	73
<i>PARTIE 5 : LES MODÈLES PRÉCLINIQUES MURINS DE MASLD ET D'ATHEROSCLEROSE.....</i>	<i>76</i>
I. Modèles précliniques murins de MASLD .....	76
II. Modèles précliniques murins d'athérosclérose .....	87
<i>PARTIE 6 : PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR <math>\alpha</math>.....</i>	<i>94</i>
I. Généralités .....	94
II. Structure .....	95
III. Profil d'expression .....	96
IV. Ligands de PPAR $\alpha$ .....	96
	10

V. Mécanismes d'action de PPAR $\alpha$ .....	98
VI. Modulation de l'activité de PPAR $\alpha$ .....	99
VII. Principaux gènes cibles de PPAR $\alpha$ et leurs fonctions .....	102
VIII. Indications cliniques des fibrates .....	105
IX. PPAR $\alpha$ et MASLD .....	105
X. PPAR $\alpha$ et athérosclérose .....	108
<b>OBJECTIFS DES TRAVAUX .....</b>	<b>114</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>120</b>
I. Expérimentation animale .....	122
II. Analyses biochimiques.....	125
III. Analyses moléculaires.....	126
IV. Analyses histologiques du foie.....	127
V. Evaluation des lésions d'athérosclérose.....	128
VI. Extraction des protéines et analyses par Western-Blot .....	128
VII. Analyses statistiques .....	128
<b>RESULTATS.....</b>	<b>130</b>
<i>PARTIE 1 : L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DU PPAR<math>\alpha</math> HEPATOCYTAIRE EST SUFFISANTE POUR AMELIORER L'ATHEROSCLEROSE DANS LES SOURIS LDLr<sup>-/-</sup> .....</i>	<i>132</i>
I. Le pemafibrate diminue les lésions d'athérosclérose dans le modèle murin <i>Ldlr<sup>-/-</sup></i> de manière PPAR $\alpha$ dépendante .....	132
II. Le pemafibrate améliore le profil lipidique athérogène dans le modèle murin <i>Ldlr<sup>-/-</sup></i> de manière PPAR $\alpha$ dépendante. ....	134
III. Le pemafibrate améliore le métabolisme des lipides et l'inflammation hépatique dans le modèle <i>Ldlr<sup>-/-</sup></i> de manière PPAR $\alpha$ dépendante. ....	136
IV. Le pemafibrate améliore le métabolisme lipidique et l'inflammation hépatique via le PPAR $\alpha$ hépatocytaire.....	139
V. Le pemafibrate améliore la dyslipidémie athérogène via l'activité de transactivation du PPAR $\alpha$ hépatocytaire.....	142
VI. Le pemafibrate réduit le développement des lésions d'athérosclérose via l'activité de transrépression de PPAR $\alpha$ .....	143
VII. Le pemafibrate limite le développement d'un phénotype pro-inflammatoire dans les hépatocytes et réduit le recrutement des leucocytes via l'activité transrépressive du PPAR $\alpha$ hépatocytaire.....	145
<i>PARTIE 2 : DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU MODELE MURIN PERTINENT DE MASLD ET D'ATHEROSCLEROSE .....</i>	<i>154</i>
I. Dimorphisme sexuel et impact de la déficience en PPAR $\alpha$ sur les caractéristiques métaboliques des souris <i>Ldlr<sup>-/-</sup></i> en réponse au régime TD .....	154
II. Dimorphisme sexuel et impact de la déficience en PPAR $\alpha$ sur les concentrations plasmatiques de lipides des souris <i>Ldlr<sup>-/-</sup></i> en réponse au régime TD.....	156
III. Dimorphisme sexuel et impact de la déficience en PPAR $\alpha$ sur le développement de la MASH dans les souris <i>Ldlr<sup>-/-</sup></i> en réponse au régime TD .....	157
IV. Dimorphisme sexuel et impact de la déficience en PPAR $\alpha$ sur la fibrose hépatique dans les souris <i>Ldlr<sup>-/-</sup></i> en réponse au régime TD.....	164

V. Dimorphisme sexuel et impact de la déficience en PPAR $\alpha$  sur le développement de l'athérosclérose dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> en réponse au régime TD..... 165

**DISCUSSION .....168**

*PARTIE 1 : L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DU PPAR $\alpha$  HEPATOCYTAIRE EST SUFFISANTE POUR AMELIORER L'ATHEROSCLEROSE DANS LES SOURIS LDLr<sup>-/-</sup> ..... 170*

*PARTIE 2 : DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU MODELE MURIN PERTINENT DE MASLD ET D'ATHEROSCLEROSE ..... 176*

**CONCLUSION.....182**

**REFERENCES.....186**

**ANNEXE 1.....216**

**ANNEXE 2.....278**

**ANNEXE 3.....284**



# RESUME

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la première cause de mortalité dans le monde. La prévalence augmentée de la maladie hépatique stéatosique associée à un dysfonctionnement métabolique (MASLD) et sa relation étroite avec le syndrome métabolique laissent suggérer un rôle du foie dans le développement de ces MCV. Cependant, le lien entre MASLD et MCV reste encore peu clair. Dans ce contexte, grâce à l'utilisation d'un modèle murin adapté et de différents outils moléculaires développés au laboratoire, j'ai pu réaliser mes travaux de thèse sur l'exploration du lien entre, d'une part le foie et la MASLD et, d'autre part le développement de l'athérosclérose à l'origine de ces MCV. De plus, le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  a été employé comme outil de modulation de la MASLD.

Le premier objectif de ma thèse était d'évaluer l'implication du foie dans les effets athéroprotecteurs du pema-fibrate, un nouvel agoniste puissant et sélectif de PPAR $\alpha$ . Pour cela, nous avons utilisé le modèle de souris double déficient pour le récepteur aux LDL (*Ldlr*<sup>-/-</sup>) et pour PPAR $\alpha$ , dans lequel l'expression du PPAR $\alpha$  sauvage ou d'un mutant de PPAR $\alpha$  (exerçant seulement l'activité de transrépression) a été restaurée uniquement dans les hépatocytes de souris grâce à des vecteurs adeno-associated virus (AAV) adaptés. Ces souris ont été soumises à un régime western supplémenté ou non avec le pema-fibrate pendant 8 semaines. Les résultats de cette étude montrent que l'activité transrépressive du PPAR $\alpha$  hépatocytaire associée aux effets anti-inflammatoires du PPAR $\alpha$  dans la MASLD est essentielle et suffisante pour induire les effets athéroprotecteurs du pema-fibrate.

Le deuxième objectif de ma thèse était de développer un nouveau modèle de souris associant un développement progressif de MASLD et d'athérosclérose dans un contexte cardiométabolique mimant la pathologie humaine. Pour cela, des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>, à la fois mâles et femelles, et déficientes ou non en PPAR $\alpha$ , ont été soumises à un régime chow ou à un régime enrichi en graisses et en cholestérol. Une cinétique d'évolution de la MASLD et de l'athérosclérose a été réalisée. Les résultats de cette étude montrent un développement progressif à la fois de la MASLD avec toutes les caractéristiques de la pathologie humaine (stéatose, inflammation, ballooning, fibrose) et de l'athérosclérose, dans un contexte pouvant associer obésité et insulino-résistance. De manière intéressante, des spécificités histologiques et métaboliques associées au genre et à la déficience en PPAR $\alpha$  ont été observées.

Ainsi, les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de montrer l'importance du foie, et plus particulièrement de l'inflammation hépatique, dans le développement de l'athérosclérose. Le nouveau modèle murin de MASLD et d'athérosclérose permettra de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la MASLD ainsi que les risques cardiovasculaires associés à cette pathologie.



## SUMMARY

According to the World Health Organization (WHO), cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death in the world. The increased prevalence of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) and its strong association with metabolic syndrome suggest a role of the liver in the development of CVD. However, the link between MASLD and CVD remains poorly understood. In this context, using an appropriate mouse model and various molecular tools developed in the laboratory, my thesis work explored the link between the liver and MASLD on one hand, and the development of atherosclerosis which leads to CVD, on the other. In addition, the nuclear receptor PPAR $\alpha$  was used as a tool to modulate MASLD.

The first aim of my thesis was to evaluate the involvement of liver in the atheroprotective effects of pemafibrate, a potent and selective PPAR $\alpha$  agonist. To do this, we used a double-knockout mouse model, deficient in both LDL receptor (*Ldlr*<sup>-/-</sup>) and PPAR $\alpha$ , and restored the expression of wild-type PPAR $\alpha$  or a PPAR $\alpha$  mutant (exerting only transrepressive activity) specifically in hepatocytes using adeno-associated virus (AAV) vectors. These mice were subjected to a western diet, with or without pemafibrate supplementation, for 8 weeks. The results of this study demonstrated that the transrepressive activity of hepatocyte PPAR $\alpha$ , associated with its anti-inflammatory properties, is essential and sufficient to induce the atheroprotective effects of pemafibrate.

The second objective of my thesis was to develop a new mouse model able of simultaneously developing progressive MASLD and atherosclerosis in a cardiometabolic context that mimics human pathology. To do this, male and female *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice expressing (*Ppara*<sup>+/+</sup>) or lacking (*Ppara*<sup>-/-</sup>) PPAR $\alpha$  were fed either a chow diet or a diet enriched in fat and cholesterol. Kinetics of MASLD and atherosclerosis progression were established. The results of this study revealed the progressive development of both MASLD, with all the human characteristics (namely steatosis, inflammation, ballooning and fibrosis), and atherosclerosis in a context that may combine obesity and insulin resistance. Interestingly, histological and metabolic features associated with sex and PPAR $\alpha$ -deficiency were observed.

In conclusion, the results obtained during my thesis demonstrate the importance of the liver, and more specifically of hepatic inflammation, in the development of atherosclerosis. The new mouse model of MASLD and atherosclerosis will help to better understand the pathophysiological mechanisms involved in MASLD and the cardiovascular risks associated with this pathology.





**COMMUNICATIONS**

## COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

- Jun 2024** Development of a new mouse model combining rapid and robust MASH, liver fibrosis and atherosclerosis: time- and sex-dependent effects  
F. Lalloyer, E. Baugé, **D. Henry**, B. Staels  
*European Association for the Study of the Liver (EASL) congress – Milan, Italie*  
*Communication affichée*
- Mai 2024** Exploring MASLD development and cardiovascular risk: characterization of a new preclinical mouse model  
F. Lalloyer, E. Baugé, **D. Henry**, B. Staels  
*92<sup>nd</sup> Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS) – Lyon, France*  
*Science at a Glance (SaaG) : e-poster et communication orale*
- Novembre 2023** Hepatocyte PPAR $\alpha$  is essential for pemafibrate-induced beneficial effects on NAFLD, dyslipidemia and atherosclerosis  
**D. Henry**, E. Baugé, N. Hennuyer, B. Derudas, E. Vallez, A. Deprince, J. Haas, P. Lefebvre, B. Staels, F. Lalloyer  
*7<sup>th</sup> EGID symposium – Lille, France*  
*Communication affichée*
- Novembre 2023** A new relevant mouse model of progressive non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and atherosclerosis development  
F. Lalloyer, E. Baugé, **D. Henry**, B. Derudas, E. Vallez, B. Staels  
*7<sup>th</sup> EGID symposium – Lille, France*  
*Communication affichée*
- Septembre 2023** Hepatocyte PPAR $\alpha$  is essential for pemafibrate-induced beneficial effects on NAFLD, dyslipidemia and atherosclerosis  
**D. Henry**, E. Baugé, N. Hennuyer, B. Derudas, E. Vallez, A. Deprince, J. Haas, P. Lefebvre, B. Staels, F. Lalloyer  
*9<sup>th</sup> Paris NASH meeting – Paris, France*  
*Communication affichée*
- Septembre 2023** A new relevant mouse model of progressive non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and atherosclerosis development  
F. Lalloyer, E. Baugé, **D. Henry**, B. Derudas, E. Vallez, B. Staels  
*9<sup>th</sup> Paris NASH meeting – Paris, France*  
*Communication affichée – Prix poster*

**Mai 2023** Pemaibrate induces atheroprotection in LDLr deficient mice through hepatocyte transrepression PPAR $\alpha$  activity

**D. Henry**, E. Baugé, N. Hennuyer, B. Derudas, E. Vallez, A. Deprince, J. Haas, P. Lefebvre, B. Staels, F. Lalloyer

**91st Congress of the European Atherosclerosis Society – Mannheim, Allemagne**  
*Communication affichée*

**Novembre 2022** The transrepressive activity of PPAR $\alpha$  induced by pemaibrate in the liver is sufficient to reduce atherosclerosis development in LDLr deficient mice

**D. Henry**, E. Baugé, N. Hennuyer, B. Derudas, E. Vallez, A. Deprince, J. Haas, P. Lefebvre, B. Staels, F. Lalloyer

**Congress Nuclear Receptor Research Network (NRRN) – Utrecht, Pays-Bas**  
*Communication affichée – Prix poster*

## COMMUNICATIONS NATIONALES

**Mars 2024** MASLD et risque cardiovasculaire : mise en place d'un nouveau modèle préclinique murin

F. Lalloyer, E. Baugé, **D. Henry**, E. Vallez, B. Staels

**Congrès de la Société Francophone du Diabète (SFD) – Toulouse, France**  
*Communication affichée*

**Juin 2023** A new relevant mouse model of progressive non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and atherosclerosis development

**D. Henry**, E. Baugé, B. Derudas, E. Vallez, B. Staels, F. Lalloyer

**18ème Congrès Annuel de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (NSFA) – Biarritz, France**  
*Communication affichée*

**Décembre 2022** The transrepressive activity of PPAR $\alpha$  induced by pemaibrate in the liver is sufficient to reduce atherosclerosis development in LDLr deficient mice

**D. Henry**, E. Baugé, N. Hennuyer, B. Derudas, E. Vallez, A. Deprince, J. Haas, P. Lefebvre, B. Staels, F. Lalloyer

**7ème Drug Discovery Day – Lille, France**  
*Communication orale*

**Juin 2022** Selective activation of hepatic PPAR $\alpha$  by pemaibrate reduces atherosclerosis development in LDLR deficient mice

**D. Henry**, E. Baugé, N. Hennuyer, B. Derudas, E. Vallez, A. Deprince, J. Haas, P. Lefebvre, B. Staels, F. Lalloyer

**17ème Congrès Annuel de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (NSFA) – Biarritz, France**  
*Communication orale*

## RESUMES DE CONGRES PUBLIES

- Août 2023** Pemaibrate induces atheroprotection in LDLr deficient mice through hepatocyte transrepression PPAR $\alpha$  activity.  
*Atherosclerosis*. 379, S17-18.  
D. Henry, E. Baugé, N. Hennuyer, B. Derudas, E. Vallez, A. Deprince, J. Haas, P. Lefebvre, B. Staels, F. Lalloyer
- Juin 2024** Development of a new mouse model combining rapid and robust MASH, liver fibrosis and atherosclerosis: time- and sex-dependent effects.  
*Journal of Hepatology*. S577, THU-234.  
F. Lalloyer, E. Baugé, D. Henry, B. Staels

# ABBREVIATIONS

<b>AAV</b> , Adeno-associated virus	<b>CYP27A1</b> , Mitochondrial sterol 27-hydroxylase
<b>ABCA1</b> , ATP-Binding cassette A1	<b>CYP4A</b> , Cytochrome P450 4A
<b>ABCG1</b> , ATP-Binding cassette G1	<b>CYP7A1</b> , Cholestérol 7 $\alpha$ -hydroxylase
<b>ACAT-1</b> , Acyl-Coenzyme A:Cholestérol Acyltransférase 1	<b>DAG</b> , Diacylglycérol
<b>ACC</b> , Acétyl-CoA Carboxylase	<b>DAMPs</b> , Danger-associated molecular patterns
<b>ACCORD</b> , Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes	<b>DBD</b> , DNA binding domain
<b>ACCORDION</b> , ACCORD Follow-on	<b>DDP-4</b> , Dipeptidyl peptidase-4
<b>Acétyl-CoA</b> , Acétyl-CoenzymeA	<b>DGAT</b> , Diacylglycérol O-Acyltransférase
<b>ACOX</b> , Acyl-CoA Oxydase	<b>DHA</b> , Acide docosahexaénoïque
<b>ACS</b> , Acetyl-CoA synthétase	<b>DIAMOND</b> , Diet Induced Animal Model Of Nonalcoholic fatty liver Disease
<b>ACSVL1</b> , Very long-chain acyl-CoA synthetase 1	<b>DPT</b> , Dermatopontine
<b>AF</b> , Activated function	<b>DR-1</b> , Direct repeat type 1
<b>AG</b> , Acides Gras	<b>DT2</b> , Diabète de type 2
<b>ALMS1</b> , Protéine 1 du syndrome d'Alström	<b>EPA</b> , Acide eicosapentaénoïque
<b>AMLN</b> , Amylin Liver MASH	<b>FABP1</b> , Fatty Acid Binding Protein-1
<b>AMPK</b> , AMP-activated protein kinase	<b>FADS2</b> , Fatty acid desaturase 2
<b>ANGPTL</b> , Angiotensin-like protein	<b>FAS</b> , Fatty Acid Synthase
<b>Apo</b> , apolipoprotéine	<b>FAT10</b> , Leukocyte antigen-F Adjacent Transcript 10
<b>APOBEC1</b> , ApoB mRNA edit catalytic polypeptide 1	<b>FATP</b> , Fatty Acid Transport Protein
<b>AP-1</b> , Activator Protein-1	<b>FDFT1</b> , Farnesyl- diphosphate farnesyltransférase 1
<b>Aramchol</b> , 3 $\beta$ -Arachidyl amido cholanoïque	<b>FGF</b> , Fibroblast growth factor
<b>ATGL</b> , Adipose Triglycéride Lipase	<b>FHS</b> , Framingham Heart Study
<b>BIEN</b> , Enzyme bifonctionnelle	<b>FIB-4</b> , Fibrosis-4
<b>BIP</b> , Bezafibrate Infarction Prevention	<b>FIELD</b> , Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes
<b>CANTOS</b> , Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcome	<b>FLI</b> , Fatty Liver Index
<b>CARM1</b> , Coactivator-associated arginine methyltransferase-1	<b>FPLC</b> , Fast protein liquid chromatography
<b>CBP</b> , cAMP response element binding protein	<b>FXR</b> , Farnesoid X Receptor
<b>CCl<sub>4</sub></b> , Tétrachlorure de carbone	<b>GAG</b> , Glycosaminoglycane
<b>CCL</b> , C-C Chemokine ligand	<b>GFP</b> , Green fluorescent protein
<b>CDAA</b> , Choline-Deficient L-Amino Acid-Defined	<b>GGT</b> , gamma-glutamyltransférase
<b>CDAHFD</b> , Choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet	<b>GLP-1</b> , Glucagon-like peptide 1
<b>CDE</b> , Choline-Deficient, Ethionine-Supplemented	<b>GLP-1R</b> , Récepteur au GLP-1
<b>CE</b> , Cholestérol estérifié	<b>GOBP</b> , Gene ontology biological process
<b>CETP</b> , Cholesteryl ester transfer protein	<b>GPDH</b> , Glycerol-3-phosphate déshydrogénase
<b>CHOP</b> , CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein	<b>GSK3</b> , Glycogène synthase kinase 3
<b>ChREBP</b> , Carbohydrate Response Element-Binding Protein	<b>HA</b> , Acide hyaluronique
<b>CK-18</b> , Cytokératine-18	<b>HbA1c</b> , Hémoglobine glyquée
<b>CML</b> , Cellules musculaires lisses	<b>HCC</b> , Carcinome hépatocellulaire
<b>COUP-TFII</b> , Chicken ovalbumin upstream promoter–transcription factor II	<b>HDL</b> , High Density Lipoprotein
<b>COX</b> , Cyclooxygénase	<b>HFD</b> , High fat diet
<b>CPT</b> , Carnitine palmitoyl acyltransférase	<b>HFCC</b> , High Fat, High Fructose and High Cholesterol
<b>CX3CL1</b> , Fractalkine	<b>HFHC</b> , High Fat High Cholesterol
<b>CXCL2</b> , C-X-C Motif Chemokine Ligand 2	<b>HHS</b> , Helsinki Heart Study
	<b>HMG-CoA</b> , Hydroxyméthylglutaryl-CoA
	<b>HNF-4</b> , Hepatocyte nuclear factor 4
	<b>HOMA</b> , Homeostasis Model Assessment
	<b>HIS</b> , Hepatic Steatosis Index
	<b>hsCRP</b> , High sensitive C-Reactive protein
	<b>HETE</b> , 8(S)-hydroxyeicosatetraenoïque

**H&E**, Hématoxyline-éosine  
**ICAM**, Intracellular Adhesion Molecule  
**IDL**, Intermediate density lipoprotein  
**IFN**, Interféron  
**IL**, Interleukine  
**IL-1RA**, Interleukin-1 receptor antagonist  
**IMC**, Indice de masse corporelle  
**IPE**, Icosapent éthyl  
**IR**, Résistance à l'insuline  
**IRM**, Imagerie par résonance magnétique  
**IRM-PDFF**, IRM-proton density fat fraction  
**JNK**, c-Jun N-terminal kinase  
**KLF6**, Krüppel-like factor 6  
**LAM**, Lipid-associated macrophages  
**LAP**, Lipid accumulation product  
**LBD**, Ligand binding domain  
**LBP**, Ligand binding pocket  
**LCAD**, Long Chain AcylCoa Dehydrogenase  
**LCAT**, Lécithine-cholestérol acyltransférase  
**LDL**, Low Density Lipoprotein  
**LDLox**, LDL oxydées  
**LDLr**, Récepteur aux LDL  
**LDN**, Lipogénèse *de novo*  
**LEADER**, Lower Extremity Arterial Disease Event Reduction  
**LPL**, Lipoprotéine lipase  
**LPS**, Lipopolysaccharide  
**LRP**, LDLr-related protein  
**LTB4**, Leukotriène B4  
**LXR**, Liver X receptor  
**MAG**, Monoacylglycérol Lipase  
**MAPK**, Mitogen-activated protein kinases  
**MAPKP38**, c-Jun N-terminal kinase/p38  
**MASH**, Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis  
**MASLD**, Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease  
**MAT1A**, Methionine adenosyltransferase 1A  
**MBOAT7**, Membrane bound O-acyltransferase domain containing 7  
**MC4R**, Récepteur à la mélanocortine  
**MCAD**, Medium Chain AcylCoa Dehydrogenase  
**MCD**, Methionine and Choline Deficient  
**MCP-1**, Monocyte Chemoattractant Protein-1  
**MCV**, Maladies cardiovasculaires  
**MMP**, Matrix Metalloproteinases  
**MTTP**, Microsomal triglyceride-transfer protein  
**MRE**, Magnetic resonance elastography  
**NAFLD**, Non-alcoholic fatty liver disease  
**NAS**, Score d'activité de NAFLD  
**NCoA6IP**, Coactivator-associated proteins PIMT  
**NCoR**, Nuclear receptor corepressor  
**NF-κB**, Nuclear Factor-κB  
**NFS**, NAFLD fibrosis score  
**NLFS**, NAFLD liver fat score  
**NLRP3**, NOD-like receptor family pyrin domain containing 3  
**NPC1L1**, Niemann-Pick C1 Like 1  
**OCA**, Acide obéticholique  
**OMS**, Organisation Mondiale de la Santé  
**PAMPs**, Pathogen associated molecular proteins  
**PAI-1**, Plasminogen activator inhibitor-1  
**PAS**, Acide périodique Schiff  
**PBP/TRAP220/DRIP250/MED1**, PPAR-interacting protein, PPAR-binding protein  
**PCSK9**, Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type-9  
**PCK1**, Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1  
**PCX**, Pyruvate carboxylase  
**PK4**, Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4  
**PGC**, PPARγ coactivator  
**PIIINP**, Type III procollagen amino terminal propeptide  
**PKA**, Protéine kinase A  
**PKC**, Protéine kinase C  
**PLIN**, Périlipines  
**PLTP**, Phospholipid transfer protein  
**PNPLA**, Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3  
**PPAR**, Peroxisome proliferator-activated receptor  
**PPRE**, Peroxisome Proliferator Response Element  
**PROMINENT**, Pema fibraté to Reduce Cardiovascular Outcomes by Reducing Triglycerides in patients With diabetes  
**PTEN**, Phosphatase and TENSin homolog  
**PVDF**, Polyfluorure de vinylidène  
**pWAT**, Tissu adipeux péri-gonadien  
**PXR**, Pregnane X receptor  
**RE**, Réticulum Endoplasmique  
**REDUCE-IT**, Reduction of Cardiovascular Events with Icosapent Ethyl-Intervention Trial  
**ROS**, Espèces réactives de l'oxygène  
**RXR**, Retinoid X Receptor  
**RYGB**, Roux-en-Y gastric bypass  
**SAA**, Sérum Amyloïde A  
**SCD1**, Stearoyl-CoA Desaturase 1  
**SGLT-2**, Sodium glucose cotransporter 2  
**siRNA**, small interfering RNA  
**SMRT**, Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor  
**SP1**, Specificity protein 1  
**SPPARMα**, Selective PPARα Modulator  
**SR-B1**, Scavenger receptor class B type 1  
**SREBP**, Sterol Regulatory Element Binding Protein  
**SRC-1**, Steroid receptor coactivator-1  
**SUMO**, Small ubiquitin-related modifier  
**TBG**, Thyroxin binding globulin  
**sWAT**, Tissu adipeux sous-cutané  
**TG**, Triglycérides  
**THR-β**, Thyroid Hormone Receptor β  
**TIMP-1**, Tissue inhibitor of metalloproteinase-1

**TM6SF2**, Transmembrane 6 superfamily member 2  
**TNF**, Tumor necrosis factor  
**TRL**, triglyceride-rich lipoprotein  
**TSP-2**, Thrombospondine 2  
**UBD**, Ubiquitin D  
**UTR**, Untranslated region  
**VA-HIT**, Veterans Affairs High-Density Lipoprotein  
Cholesterol Intervention Trial  
**VCAM-1**, Vascular Cell Adhesion Molecule-1  
**VEGFR-2**, Vascular endothelial growth factor  
receptor-2

**Vit E**, Vitamine E  
**VLCAD**, Very Long Chain AcylCoa Dehydrogenase  
**VLDL**, Very low density lipoprotein  
**VLDLr**, Récepteur aux VLDL  
**4S**, Scandinavian Simvastatin Survival Study





**INTRODUCTION**



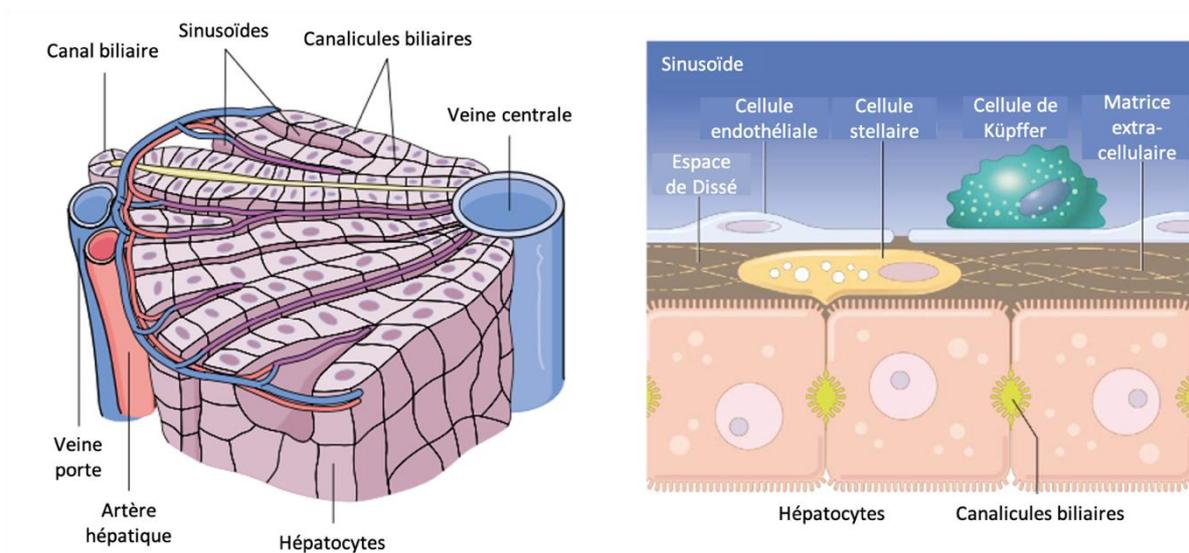
## PARTIE 1 : LE FOIE

En raison de ses multiples fonctions (fonctions vasculaires, biliaires, immunologiques, métaboliques, synthèse et stockage, épuration, détoxification), le foie est un organe essentiel du corps humain. Il représente environ 2% de la masse corporelle adulte et est doublement irrigué par la veine porte et l'artère hépatique, ce qui en fait un organe unique.

### I. Structure du foie

Chez l'Homme, le foie est divisé en 4 lobes : le lobe droit et le lobe gauche qui représentent les deux lobes principaux séparés par le ligament falciforme, ainsi que le lobe carré et le lobe caudé. Chaque lobe est formé de lobules (unités fonctionnelles du foie) de forme hexagonale. A chaque extrémité des lobules se trouve une triade portale constituée du canal biliaire, de la veine porte et de l'artère hépatique. Les lobules sont composés de travées d'hépatocytes organisées autour de la veine centrale. Les sinusoides assurent la circulation sanguine entre les lobules, de la triade portale vers la veine centrale.

Les hépatocytes représentent 60% des cellules du foie et 80% du volume du foie, mais il existe également d'autres types cellulaires (**Figure 1**). En effet, les sinusoides sont tapissés de cellules endothéliales plates assurant les échanges entre le sang et l'espace périsinusoïdal appelé espace de Disse. De plus, dans les sinusoides, se trouvent également des macrophages résidents hépatiques, les cellules de Kupffer. Ce sont les principales cellules phagocytaires du foie qui peuvent constituer une source importante de production de cytokines en cas de lésion hépatique. L'espace de Disse contient également des cellules stellaires (5% des cellules hépatiques) qui jouent un rôle clé dans la fibrose hépatique car, une fois activées, elles sont responsables de la production de fibres de collagène<sup>1</sup>.



**Figure 1 : Organisation structurale du foie d'après Haschek et al., 2010<sup>2</sup>**

Le foie est également un organe immunitaire important. En effet, en cas d'infection ou de lésions hépatiques, même si ce ne sont pas des cellules immunitaires, les hépatocytes et les cellules endothéliales sont capables d'exprimer des molécules d'adhésion et des récepteurs impliqués dans la réponse inflammatoire, conduisant au recrutement de nouvelles cellules inflammatoires telles que les lymphocytes T, les neutrophiles ou les monocytes. Ces nouvelles cellules vont alors participer à la progression de l'inflammation dans le foie, en communication avec les cellules de Kupffer et les cellules stellaires déjà présentes<sup>3</sup>.

## **II. Les fonctions métaboliques du foie**

Le foie est un des organes les plus polyvalents dans l'organisme. Il possède de multiples fonctions : notamment, il constitue un centre de commandes métaboliques avec une implication essentielle dans de nombreux métabolismes tels que le métabolisme des lipides, des glucides et des protéines.

### **A. Métabolisme des lipides**

Le foie exerce un rôle majeur dans le métabolisme des lipides : synthèse des acides gras (AG), triglycérides et phospholipides ; synthèse des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et de l'apoA1, composante principale des lipoprotéines de haute densité (HDL) ; synthèse du cholestérol.

Il existe 3 sources majeures d'AG présents dans le foie :

- ✓ Les lipides alimentaires (voie entérohépatique)
- ✓ Les AG dérivés du tissu adipeux
- ✓ La lipogénèse *de novo* (LDN) à partir du glucose

Les AG et le cholestérol provenant de l'alimentation sont absorbés au niveau des entérocytes et sont libérés dans la circulation sanguine sous forme de lipoprotéines. Dans la circulation sanguine, les lipoprotéines vont être hydrolysées et vont libérer des AG qui seront captés par le foie grâce à différents récepteurs tels que les fatty acid transport protein (FATP), CD36 ou la caveoline-1<sup>4</sup>. En plus de l'hydrolyse des lipoprotéines, les AG libres trouvés dans la circulation peuvent également provenir de leur hydrolyse au niveau du tissu adipeux (lipolyse). Toutefois, le foie est également capable de synthétiser des AG via la lipogénèse *de novo* (LDN). En effet, lorsque les concentrations cellulaires de glucose sont trop importantes, ce glucose peut être transformé en AG complexe grâce à la LDN faisant intervenir plusieurs enzymes importantes telles que l'acetyl-CoA carboxylase (ACC) et la fatty acid synthase (FAS) (Figure 2). La LDN est régulée par divers facteurs de transcription notamment la carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) qui est activée par le glucose et la sterol regulatory element binding protein (SREBP) 1c qui est activée par l'insuline et inhibée par les AG polyinsaturés<sup>5</sup>.

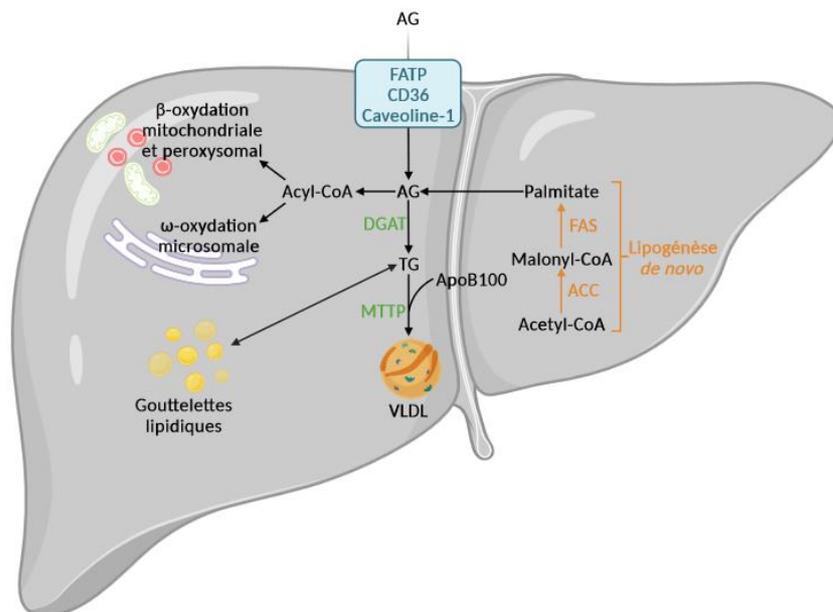


Figure 2 : Métabolisme hépatique des AG

Les AG hépatiques peuvent être ensuite éliminés par oxydation, ou être utilisés pour former des TG qui seront soit stockés sous forme de gouttelettes lipidiques, soit utilisés dans la synthèse des VLDL (**Figure 2**). Les gouttelettes lipidiques sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) par bourgeonnement, où est localisée la diacylglycérol O-acyltransférase (DGAT) nécessaire à la synthèse des TG. L'hydrolyse des gouttelettes lipidiques est complexe et fait intervenir de nombreuses protéines qui influencent directement ou indirectement ce processus. Parmi ces protéines, on retrouve les périlipines (PLIN), l'adipose triglycéride lipase (ATGL) ou encore la monoacylglycerol lipase (MAG)<sup>6</sup>. Par ailleurs, les TG peuvent être sécrétés dans la circulation sanguine dans les lipoprotéines de très basse densité VLDL. Ces VLDL sont assemblées au niveau du RE dans les hépatocytes grâce à la microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) et à l'apolipoprotéine B (apoB) et sont sécrétées dans la circulation grâce à leur intégration dans des vésicules de sécrétion au niveau de l'appareil de Golgi<sup>4</sup>.

Tout comme les TG, le cholestérol est transporté par les lipoprotéines dans la circulation sanguine. Ces lipoprotéines peuvent être captées par le foie et par d'autres tissus périphériques grâce à plusieurs récepteurs dont le récepteur aux protéines de basse densité (Low Density Lipoprotein, LDL) (LDLr), le récepteur aux VLDL (VLDLr), le LDL-related protein (LRP) et le scavenger receptor class B type 1 (SR-B1), libérant leur contenu en cholestérol au niveau hépatique. C'est une des principales sources de cholestérol du foie. Le cholestérol peut également être directement synthétisé au niveau du foie à partir de l'acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA) qui provient de la  $\beta$ -oxydation des AG. L'acétyl-CoA est utilisé pour former l'hydroxyméthylglutaryl-CoA (HMG-CoA). L'étape limitante dans la voie de synthèse du cholestérol est la conversion de l'HMG-CoA en acide mévalonique par l'HMG-CoA réductase. Les protéines impliquées dans la régulation du métabolisme du cholestérol, telles que l'HMG-CoA réductase, sont transcrites en fonction de la quantité de cholestérol cellulaire par le facteur de transcription SREBP-2. Quand les cellules sont privées de cholestérol, SREBP-2 induit l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de cholestérol comme l'HMG-CoA réductase. En revanche, quand les concentrations en cholestérol sont suffisantes, SREBP-2 bloque la transcription de ces gènes maintenant ainsi l'homéostasie du cholestérol. Tout

comme les TG, le cholestérol peut être stocké dans le cytoplasme au niveau des gouttelettes lipidiques ou il peut être utilisé pour la synthèse des VLDL avec les TG et l'apoB<sup>7</sup>.

### **B. Métabolisme des protéines**

En plus du métabolisme des lipides, le foie joue également un rôle important dans le métabolisme des **protéines**. En effet, les acides aminés, unités formant les protéines, peuvent subir plusieurs modifications dans le foie afin d'être utilisés pour produire de l'énergie, des sucres ou des lipides. Parmi ces modifications, on trouve la transamination et/ou la désamination catalysée par l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT). Ces enzymes sont sécrétées dans le sang lors de la cytolysse hépatique servant alors de marqueur plasmatique témoignant d'une altération hépatique. Le foie est également le lieu de synthèse de toutes les protéines plasmatiques sauf les Ig (par exemple l'albumine qui est la protéine majeure retrouvée dans le sang ou la CRP, protéine majeure de l'inflammation) ainsi que de la majorité des facteurs de coagulation <sup>1</sup>.

### **C. Métabolisme des glucides**

Par ailleurs, le foie est un acteur important de **l'homéostasie glucidique**. Son rôle est de maintenir la glycémie constante, soit en favorisant le stockage du glucose, soit sa redistribution. En période post-prandiale, le glucose rentre dans le foie grâce au transporteur de glucose 2 (GLUT2). Il est alors soit utilisé directement par la cellule pour lui apporter de l'énergie par la glycolyse, soit stocké sous forme de glycogène par le processus de glycogénogénèse. En période de jeûne, quand la glycémie diminue, le foie est capable de libérer du glucose à partir du glycogène vers les tissus périphériques grâce à la glycogénolyse. Si les stocks de glycogène deviennent insuffisants (par exemple en période de long jeûne), le foie est capable de produire *de novo* du glucose à partir de lactate, d'acides aminés et de glycérol via la néoglucogénèse. Ces processus sont influencés par la sécrétion d'insuline et de glucagon produits respectivement par les cellules  $\alpha$ - et  $\beta$ -pancréatiques, en réponse aux variations de glycémie<sup>5</sup>.

### **D. Les autres fonctions du foie**

Le foie exerce des fonctions de **stockage** puisqu'il permet le stockage des vitamines liposolubles (A, D, E, K), le stockage de la vitamine B12 et l'activation de la vitamine D (grâce à

la 25 $\alpha$ -hydroxylase présente dans le foie). Il permet également le stockage du fer sous forme de ferritine.

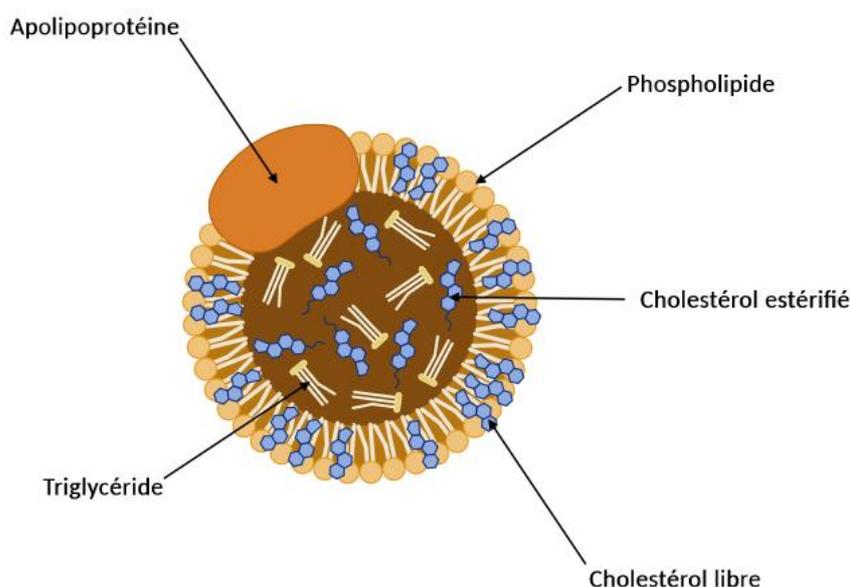
De plus, un des rôles majeurs du foie est lié à sa fonction **exocrine** de par sa capacité de **synthèse et de sécrétion de la bile**. En effet, pour éliminer le cholestérol, le foie est capable de le convertir en acides biliaires. Chez l'Homme, les acides biliaires primaires tels que l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique sont synthétisés à partir du cholestérol exclusivement dans le foie selon deux voies : la voie classique impliquant notamment la cholestérol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) qui catalyse la première étape limitante de cette voie ; et la voie alternative qui fait intervenir la mitochondrial sterol 27-hydroxylase (CYP27A1). Ces acides biliaires primaires sont ensuite transportés dans la bile et stockés dans la vésicule biliaire puis rejoindront l'intestin via le canal biliaire pour être métabolisés en acides biliaires secondaires par les enzymes bactériennes afin d'être éliminés dans les fèces (5%) ou réabsorbés par les entérocytes (95%). Afin de maintenir un pool constant d'acides biliaires, la perte de 5% est compensée par la synthèse d'acides biliaires dans le foie. Le cholestérol peut également être directement transporté dans la bile grâce aux ATP-binding cassette ABCG5 et ABCG8 et réintégrer la circulation entérohépatique<sup>8</sup>.

Enfin, le foie est capable de dégrader certaines substances toxiques pour l'organisme et exerce une fonction importante de **détoxification**. Certaines de ces substances peuvent être endogènes et issues des voies métaboliques ou exogènes. Par exemple, l'ammoniaque formé au niveau du colon, toxique pour certains tissus humains, est converti en urée par les hépatocytes via la formation d'ornithine. L'urée est libérée dans le sang pour être transportée jusqu'aux reins où elle sera éliminée dans les urines. Le foie peut également éliminer la bilirubine soluble synthétisée lors de la dégradation de l'hémoglobine. Il va ainsi conjuguer la bilirubine la rendant non toxique permettant son élimination dans la bile. Il exerce également un rôle de détoxification des xénobiotiques exogènes tels que l'alcool ou les médicaments. En effet, le foie possède la plupart des enzymes de phase I (oxydation, réduction, hydrolyse, hydratation, déshalogénéation) avec notamment les cytochromes P450, et les enzymes de phase II responsables des réactions de conjugaison. Ces xénobiotiques seront ensuite éliminés dans les urines ou dans la bile<sup>9</sup>.

## PARTIE 2 : LES LIPOPROTEINES

### I. Généralités

En raison de leur nature hydrophobe, les lipides sont transportés dans la circulation sanguine via des lipoprotéines. Les lipoprotéines sont constituées d'une couche externe amphiphile composée de phospholipides, de cholestérol libre et de protéines appelées apolipoprotéines (apo). Cette couche amphipathique entoure un cœur lipidique hydrophobe composé de TG et de cholestérol estérifié (CE) (**Figure 3**).



**Figure 3 : Structure générale d'une lipoprotéine**

Plusieurs classes de lipoprotéines ont été décrites en fonction de leur taille, de leur densité et de leur composition lipidique et protéique. Parmi ces lipoprotéines, on trouve :

- Les chylomicrons
- Les lipoprotéines de très basse densité (VLDL, Very Low Density Lipoprotein)
- Les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL, Intermediate Density Lipoprotein)
- Les lipoprotéines de basse densité (LDL, Low Density Lipoprotein)
- Les lipoprotéines de haute densité (HDL, High Density Lipoprotein) (**Tableau 1**)<sup>10</sup>.

On trouve également la lipoprotéine (a) (Lp(a)) qui présente les mêmes caractéristiques que les LDL mais qui est en plus, associée à une autre apolipoprotéine, l'apo(a). Son rôle et son

métabolisme sont encore peu connus mais plusieurs études ont montré qu'il semble important de considérer la Lp(a) dans le risque cardiovasculaire<sup>11-13</sup>. Les chylomicrons et les VLDL sont principalement composés de TG tandis que les LDL sont principalement composées de cholestérol estérifié. Les chylomicrons sont synthétisés par l'intestin en période postprandiale et sont composés majoritairement de TG et de très peu de cholestérol. Les VLDL, synthétisées uniquement par le foie, sont également composées majoritairement de TG mais comparées aux chylomicrons, elles présentent moins de TG et plus de cholestérol. L'hydrolyse des VLDL va conduire à la formation d'IDL puis de LDL. Les IDL conservent une teneur en TG similaire au VLDL tandis que les LDL sont, elles, majoritairement composées de cholestérol. Les HDL sont produites à la fois par l'intestin et par le foie et elles sont constituées majoritairement de cholestérol et de très peu de TG<sup>4</sup>.

Lipoprotéines	Chylomicrons	VLDL	IDL	LDL	HDL	Lp(a)
Densité (g/mL)	<0.93	0.93- 1.006	1.006- 1.019	1.019- 1.063	1.063- 1.21	1.040- 1.115
Taille (nm)	75-1200	30-80	27-35	18-27	7-12	25
Proportion (CE/TG)	1/19	1/3.3	1/3.5	1/0.23	1/0.19	nd
Apolipoprotéines majoritaires	AI, AIV, AV, B48, CI, CII, CIII, E	AV, B100, CI, CII, CIII, E	B100, E	B100, E	AI, AII, AIV, AV, CI, CII, CIII, E	Apo(a)

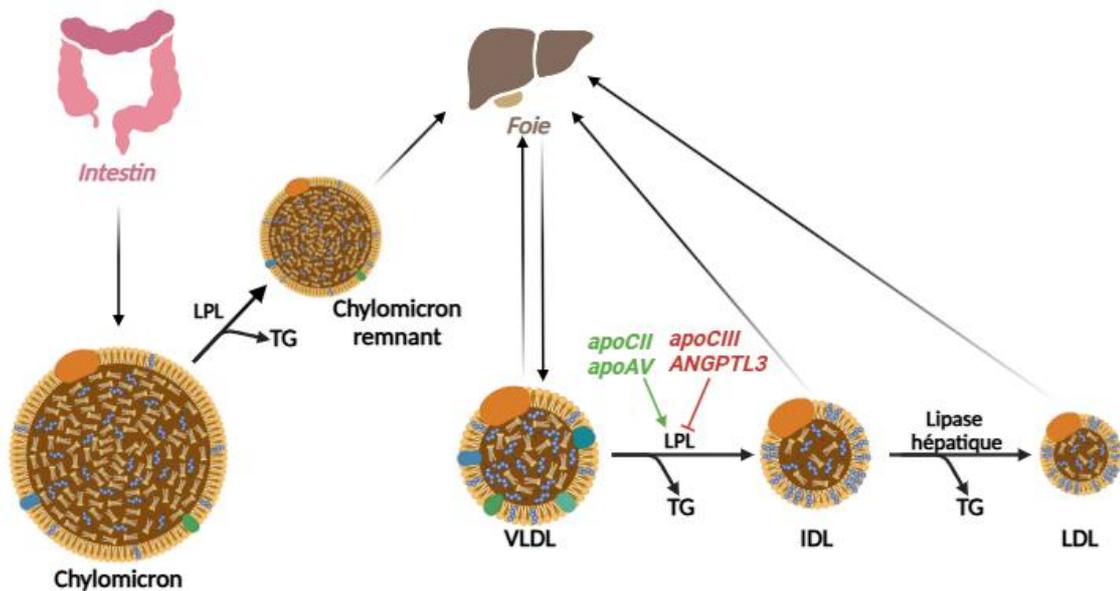
*Tableau 1 : Classification des lipoprotéines plasmatiques humaines*

## II. Métabolisme des lipoprotéines

### A. *Métabolisme des chylomicrons*

Concernant le métabolisme des lipoprotéines, en période postprandiale, les entérocytes vont absorber les AG et le cholestérol alimentaire grâce à de nombreuses protéines telles que les FABP, les FATP, CD36, Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) ou encore les récepteurs éboueurs SR-B1. Au niveau de l'entérocyte, l'apoB48 et MTTP vont permettre d'assembler ces lipides absorbés sous forme de chylomicrons riches en TG qui seront sécrétés dans la circulation. Une fois dans la circulation, les chylomicrons vont être métabolisés grâce à l'hydrolyse de leur TG en AG par la lipoprotéine lipase (LPL), et grâce à la captation des particules résiduelles par les

tissus périphériques et le foie via différents récepteurs tels que le LDLr ou le LRP. L'activité de la LPL est régulée par plusieurs apolipoprotéines et angiopoïétin-like proteins (ANGPTL). Par exemple, l'apoCII et l'apoAV stimulent l'activité de la LPL tandis que l'apoCIII et l'ANGPTL3 l'inhibent. L'action de la LPL va alors appauvrir le contenu en TG des chylomicrons conduisant à la formation de chylomicrons remnants, particules résiduelles de chylomicrons, qui vont ensuite être captées par le foie grâce à leur apoE. Parallèlement, les VLDL, synthétisées par le foie, sont également hydrolysées par la LPL, donnant naissance aux IDL, puis, après une seconde hydrolyse par la lipase hépatique, à des lipoprotéines pauvres en TG mais riches en cholestérol : les LDL<sup>4</sup> (Figure 4). De plus, dans la circulation, les lipoprotéines peuvent également subir des remodelages de leur contenu lipidique grâce à la cholesteryl ester transfer protein (CETP). Cette protéine est capable de transférer le CE depuis les HDL vers les VLDL ou les LDL en échange de TG des VLDL/LDL vers les HDL. La protéine CETP joue un rôle dans la régulation des concentrations plasmatiques de LDL-C, et il est intéressant de noter que par rapport à l'Homme, les souris ne possèdent pas cette protéine<sup>14</sup> expliquant leur profil lipoprotéique riche en HDL-C, différent de celui de l'Homme plutôt riche en LDL-C.



**Figure 4 : Métabolisme intravasculaire des lipoprotéines**

### **B. Métabolisme des VLDL**

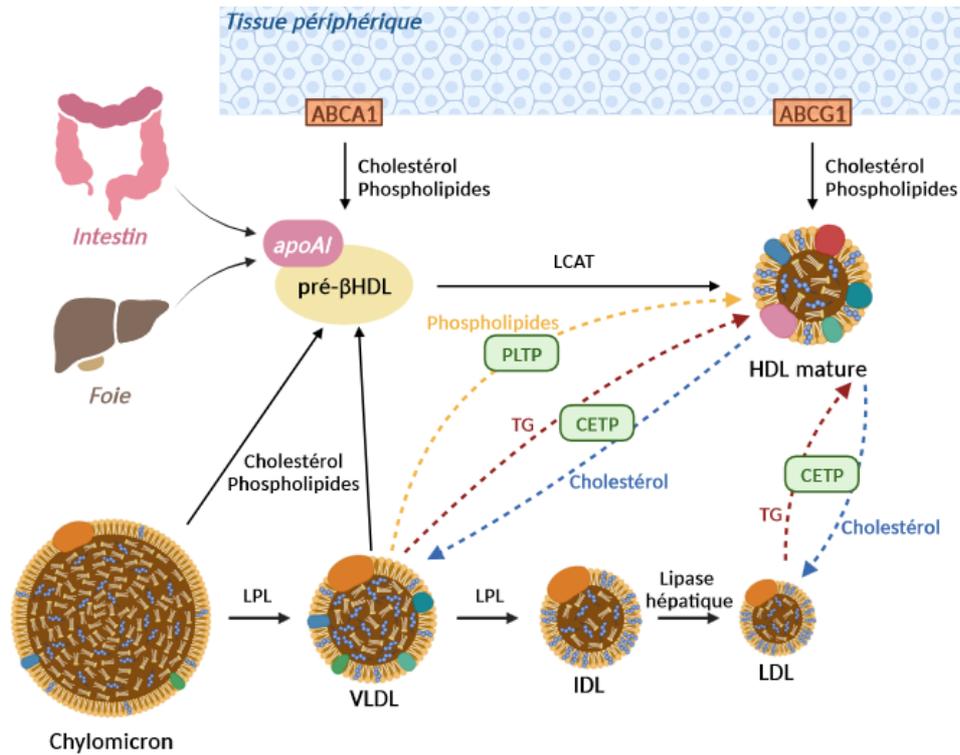
Par ailleurs, en plus de leur formation suite à l'hydrolyse des chylomicrons, les VLDL peuvent également être synthétisées directement au niveau du foie. En effet, comme déjà évoqué précédemment, les VLDL sont synthétisées au niveau du RE des hépatocytes où est

produit l'apoB100 et les TG, grâce à la présence de MTTP et de manière similaire à la synthèse des chylomicrons au niveau des entérocytes. Lors de la synthèse des VLDL, des apolipoprotéines telles que l'apoE vont également s'intégrer dans la lipoprotéine pour la stabiliser, puis elle va poursuivre sa formation dans l'appareil de Golgi avant d'être libérée dans la circulation sanguine grâce à leur intégration dans des vésicules de sécrétion. Il est important de souligner qu'il existe deux formes d'apoB chez l'Homme et les rongeurs : l'apoB100 ainsi que l'apoB48 qui est une forme tronquée de l'apoB100. L'apoB48 est synthétisée à partir de l'apoB100 grâce à l'enzyme apoB mRNA edit catalytic polypeptide-1 (APOBEC1). Chez l'Homme, l'APOBEC1 est exprimée seulement dans l'intestin alors que chez la souris elle est exprimée dans la plupart des tissus notamment l'intestin mais également le foie<sup>15</sup>.

### **C. Métabolisme des HDL**

Les HDL jouent un rôle important dans le transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. La première étape de formation des HDL est la synthèse de leur protéine principale, l'apoAI, au niveau du foie mais également au niveau de l'intestin. Une fois sécrétée, l'apoAI va être associée à du cholestérol et des phospholipides grâce à l'ATP-binding cassette A1 (ABCA1) formant ainsi des HDL natives appelées pré $\beta$ -HDL. Initialement, le cholestérol et les phospholipides des pré $\beta$ -HDL proviennent du foie et de l'intestin, mais par la suite, elles peuvent se gorger de lipides provenant d'autres tissus périphériques et de lipoprotéines. Par exemple, les pré $\beta$ -HDL peuvent acquérir du cholestérol et des phospholipides des chylomicrons et des VLDL suite à leur lipolyse par la LPL. Ensuite, la formation des HDL matures fait intervenir la lecithine-cholesterol acyltransférase (LCAT), activée par l'apoAI, qui permet d'estérifier le cholestérol entraînant la migration des particules de CE de la surface vers le cœur hydrophobe de la lipoprotéine (**Figure 5**)<sup>10</sup>.

De plus, au niveau de la circulation sanguine, les HDL vont également subir des remodelages. Comme déjà mentionné précédemment, elles vont pouvoir s'enrichir en TG et transférer leur cholestérol grâce à leurs échanges avec les VLDL et les LDL sous l'action de la protéine CETP. Suite à cet enrichissement en TG, les HDL vont alors constituées des substrats pour la lipase hépatique conduisant à leur hydrolyse et réduisant leur taille. Enfin, la phospholipid transfer protein (PLTP) va également permettre d'échanger les phospholipides entre les HDL mature et les lipoprotéines riches en TG<sup>10</sup>.



**Figure 5 : Métabolisme des HDL**

Pour finir, les HDL peuvent acquérir du cholestérol des tissus périphériques via plusieurs récepteurs tels que ABCA1 (pour les pré-βHDL) mais également l'ATP-binding cassette G1 (ABCG1). Une fois que le cholestérol intracellulaire est transféré dans les HDL, celles-ci sont capturées par le foie via SR-B1 afin de métaboliser le cholestérol au niveau hépatique par sa sécrétion directe dans la bile ou sa conversion en acides biliaires. Les HDL sont ensuite recyclées afin de régénérer des particules pré-βHDL. Ce transport inverse du cholestérol des tissus périphériques au foie pour être métabolisé, confère aux HDL, leur propriété protectrice<sup>4</sup>.



## PARTIE 3 : LA MALADIE DU FOIE STÉATOSIQUE ASSOCIÉE À UN DYSFONCTIONNEMENT MÉTABOLIQUE (MASLD)

### I. Définition

La maladie stéatosique du foie associée à un dysfonctionnement métabolique (Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease, MASLD) se définit par la présence de stéatose hépatique et de facteurs de risque cardio-métaboliques sans autres causes de stéatose telles que l'alcool par exemple (Figure 6).

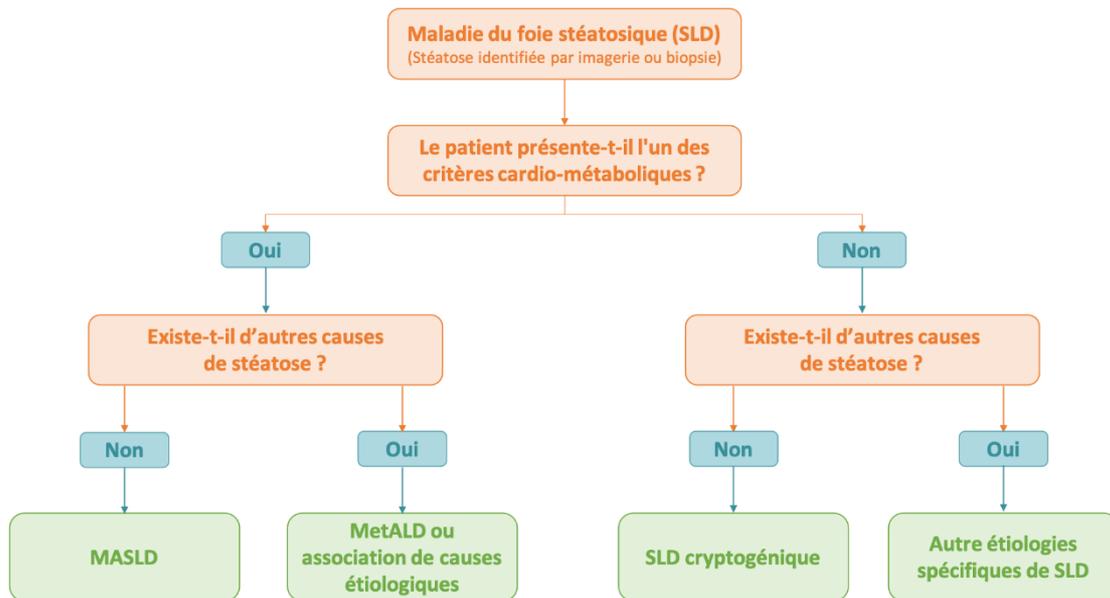


Figure 6 : Critères de diagnostic de la MASLD selon Rinella et al., 2023<sup>16</sup>

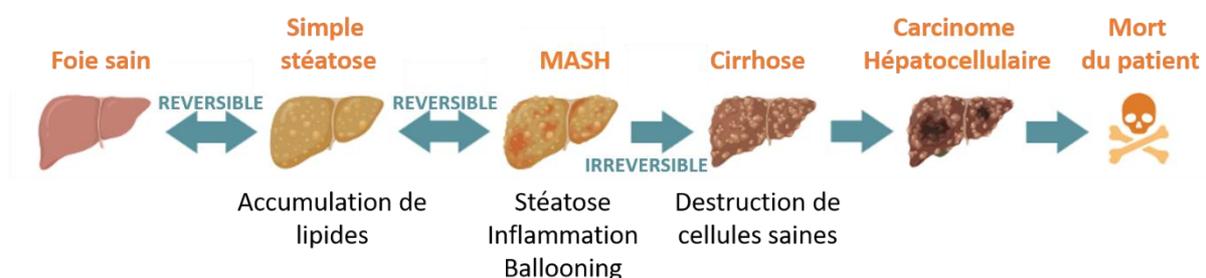
Ainsi, la MASLD se caractérise par la présence de stéatose hépatique associée à au moins 1 des 5 critères cardio-métaboliques suivants :

- ✓ IMC  $\geq 25\text{kg/m}^2$  ou tour de taille  $> 94\text{cm}$  (homme) et  $> 80\text{cm}$  (femme) (valeurs ajustées en fonction de l'ethnie)
- ✓ Glycémie à jeun  $> 100\text{mg/dL}$  ou glycémie 2 heures après un repas  $> 140\text{mg/dL}$  ou hémoglobine glyquée (HbA1c)  $> 5,7\%$  ou présence d'un diabète de type 2 (DT2) ou d'un traitement anti-DT2
- ✓ Hypertension  $\geq 130/85\text{mmHg}$  ou traitement anti-hypertenseur
- ✓ TG plasmatiques  $\geq 150\text{mg/dL}$  ou traitement hypolipémiant

- ✓ HDL-C plasmatiques < 40 mg/dL (homme) et < 50 mg/dL (femme) ou traitement hypolipémiant

Il est important de noter que depuis juin 2023, le terme MASLD remplace le terme maladie du foie gras non-alcoolique (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) afin d'améliorer la sensibilisation et l'identification des patients. En effet, l'ancien terme NAFLD se réfère directement à une altération hépatique non liée à l'alcool et ne représente pas le dysfonctionnement métabolique et le risque cardiovasculaire associés à cette pathologie hépatique, c'est pourquoi le terme MASLD a été adopté. Cependant, même si la NAFLD et la MASLD ne possèdent pas la même définition, la différence entre ces deux nomenclatures est minime et il est considéré que les résultats des études plus anciennes sur la NAFLD restent valables dans le cadre de la nouvelle définition de la MASLD<sup>16</sup>.

Aujourd'hui, avec une prévalence mondiale estimée à environ 30% qui ne cesse d'augmenter (+50% sur les trois dernières décennies), la MASLD est la maladie du foie la plus répandue dans le monde et représente la principale cause de morbidité et de mortalité hépatique<sup>17,18</sup>. Cette pathologie se caractérise par plusieurs stades qui se manifestent, dans un premier temps, par une accumulation excessive de lipides dans le foie. Cette stéatose bénigne peut évoluer vers la stéatohépatite associée à un dysfonctionnement métabolique (Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis, MASH) associant stéatose, inflammation et dégénérescence des hépatocytes appelée ballooning. Dans de rares cas, la MASH évolue vers la fibrose, la cirrhose et enfin le carcinome hépatocellulaire (HHC) pouvant entraîner la mort du patient (Figure 7). Cependant, plusieurs études ont montré que les maladies cardiovasculaires (MCV) restent la principale cause de mortalité chez les personnes atteintes de MASLD<sup>19</sup>.



*Figure 7 : Stades d'évolution de la MASLD*

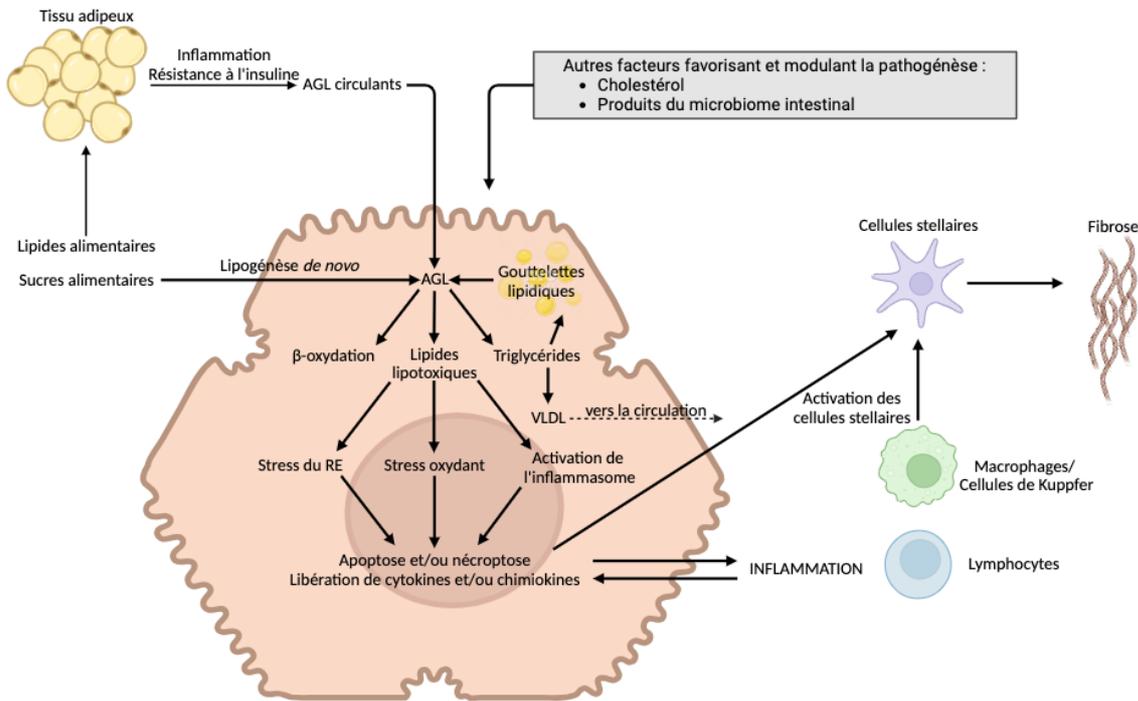
## II. Facteurs de risque

Parmi les facteurs de risque de la MASLD, l'obésité et le DT2 sont les plus fortement associés à cette pathologie, mais on trouve également l'âge et le sexe masculin <sup>18</sup>.

En outre, plusieurs études génétiques ont identifié certains variants de plusieurs gènes impliqués dans le contrôle du métabolisme des lipides associés à un risque élevé de développement de la MASLD. Parmi ces gènes, les plus fréquents sont patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3)<sup>20</sup>, transmembrane 6 superfamily member 2 (TM6SF2)<sup>21</sup>, farnesyl- diphosphate farnesyltransférase 1 (FDFT1)<sup>22</sup> et membrane bound O-acyltransferase domain containing 7 (MBOAT7)<sup>23</sup>.

## III. Mécanismes physiopathologiques

Malgré un grand nombre d'études, les mécanismes responsables de la progression de la MASLD restent à ce jour peu connus. Une première hypothèse émise à la fin des années 90 par Day et James suggère que le mécanisme de développement de la MASH se produit en deux temps (« Two-hits hypothesis »)<sup>24</sup>. Le premier évènement, qui est réversible, correspond au développement de stéatose, témoignant d'un dysfonctionnement du métabolisme des lipides hépatiques. Cette accumulation de lipides sensibiliserait le foie et favoriserait le développement de la MASH, caractérisée par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et donc d'un stress oxydatif induisant une réponse inflammatoire. Ces phénomènes sont considérés comme le second « hit ». Le dogme où la stéatose précédait toujours l'inflammation semble dépassé puisque de multiples facteurs agissant en synergie rentrent en jeu et il n'est ainsi plus certain que la MASH soit toujours précédée par une stéatose. Les mécanismes menant à cette pathologie et leurs manifestations cliniques semblent en fait très hétérogènes. Par conséquent, aujourd'hui l'hypothèse « Two-hits » a été remplacée par l'hypothèse « Multiple-hits ». L'accumulation de lipides hépatiques, la résistance à l'insuline, le dysfonctionnement mitochondrial, le stress du RE, le microbiote intestinal, les endotoxines, les facteurs génétiques et épigénétiques ainsi que l'altération du dialogue métabolique entre les différents organes sont maintenant pris en compte (**Figure 8**).



**Figure 8 : Principaux mécanismes impliqués dans la pathogénèse de la MASLD, d'après Friedman et al., 2018<sup>25</sup>**

### A. Accumulation des lipides intra-hépatiques

La MASLD se caractérise par une accumulation excessive de lipides, principalement des TG dans le cytoplasme des hépatocytes en raison d'un afflux important d'AG libres provenant de la circulation et de la LDN. Au niveau du tissu adipeux, les TG sont hydrolysés et les AG sont relargués dans la circulation pour rejoindre le foie. Ce processus de lipolyse est régulé par l'action de l'insuline sur les adipocytes. La résistance à l'insuline (par exemple, en cas d'obésité ou de diabète) cause une dérégulation de la lipolyse entraînant un apport excessif d'AG au foie, ce qui contribue au développement de la MASH<sup>26</sup>. Dans le foie, les AG sont liés de manière non covalente à la fatty acid binding protein-1 (FABP1) et sont principalement métabolisés soit par la  $\beta$ -oxydation, soit par estérification pour former des TG. Lorsque l'apport en AG dépasse la capacité de  $\beta$ -oxydation, l'acyl-CoA accumulé est utilisé pour la biosynthèse des TG qui ne sont pas exportés dans la circulation par le foie sous forme de VLDL. Ceci induit la formation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes et la présence de stéatose hépatique. En effet, l'accumulation d'AG ou d'acyl-CoA est plus néfaste pour le foie que l'accumulation de TG elle-même. Dans le cas de MASLD, environ 60 % de la teneur en TG du foie provient des AG non estérifiés circulants, et les 40 % restants sont issus de la LDN ou de l'alimentation<sup>27</sup>.

La MASH se caractérise par une stéatose accompagnée d'une inflammation, de dégénérescence des hépatocytes, appelée ballooning, avec présence d'une fibrose plus ou moins importante. Ces atteintes impliquent des mécanismes liés à la dérégulation mitochondriale, au stress du RE, à l'activation de l'inflammasome et de l'inflammation, et à l'activation des voies apoptotiques. Des facteurs externes, comme le dérèglement de la production de cytokines et des adipokines ainsi que le microbiome intestinal, peuvent moduler à distance le développement du stress et de l'inflammation au niveau des hépatocytes. La contribution relative de ces atteintes chez les patients MASH n'est pas encore clarifiée et varie probablement d'un individu à l'autre<sup>25</sup>.

### ***B. L'inflammasome et l'inflammation***

Des études pré-cliniques chez la souris ont montré que l'activation de l'inflammasome hépatocytaire peut être un lien important entre le stress métabolique, la mort des hépatocytes et la stimulation de la fibrogénèse dans la MASH. L'inflammasome est un complexe cytoplasmique multiprotéique qui réagit aux danger-associated molecular patterns (DAMPs) tels que les AG produits de la DNL, ainsi qu'aux pathogen-associated molecular proteins (PAMPs) tels que les produits du microbiote intestinal acheminés vers le foie dans la circulation. L'activation de l'inflammasome hépatique entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18, et favorise l'apoptose par l'activation de la caspase-1<sup>25</sup>.

Par ailleurs, l'apoptose des hépatocytes et la libération de DAMPs et de PAMPs entraînent également l'activation des autres types cellulaires, comme les cellules de Kupffer qui vont sécréter elles aussi des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, ou les cellules endothéliales qui vont produire des chimiokines et permettre le recrutement de nouvelles cellules inflammatoires comme les lymphocytes et les monocytes au niveau du foie. Ces phénomènes vont également favoriser la différenciation des cellules stellaires en myofibroblastes producteurs de collagène, produisant également des cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques.

### ***C. La résistance à l'insuline***

La résistance à l'insuline (IR) est une caractéristique commune de la MASLD contribuant à sa pathogénèse. L'IR peut conduire à une augmentation des concentrations intracellulaires de

dérivés d'AG, comme le diacylglycérol (DAG), l'acyl-CoA ou les céramides. Une augmentation progressive du rapport TG/DAG a été montrée dans des foies sains évoluant vers la MASLD puis vers la MASH. De plus, au niveau du tissu adipeux, l'IR entraîne une libération anormale d'AG due à une lipolyse dérégulée participant à l'accumulation excessive de TG dans le foie et au développement de la stéatose hépatique. De plus, l'IR provoque également une diminution de l'absorption du glucose dans les tissus non hépatiques (tissu adipeux, muscle) conduisant à sa redirection vers le foie et favorisant la LDN via l'activation de ChREBP, et entraînant le développement d'une stéatose hépatique<sup>27</sup>.

Un autre lien entre les dysfonctionnements du foie et du tissu adipeux est l'enzyme dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4), qui peut favoriser la résistance à l'insuline. La DPP-4 circulante est sécrétée par les hépatocytes et agit avec le facteur Xa plasmatique pour stimuler les macrophages inflammatoires dans le tissu adipeux viscéral chez la souris. Cet effet est connu pour favoriser l'IR, ce qui souligne l'importance des échanges entre le foie et d'autres tissus dans le développement de la MASLD<sup>25</sup>.

#### ***D. La dysfonction mitochondriale***

Dans un premier temps, les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale présentent des activités réduites dans les échantillons de foie provenant de patients MASH<sup>28</sup>. Le régulateur clé du transport des AG du cytosol vers les mitochondries et du flux de  $\beta$ -oxydation mitochondrial hépatique est la carnitine palmitoyl transférase (CPT)-1. Cette enzyme est sensible au malonyl-CoA généré par l'ACC, un régulateur important de la LDN. Par ailleurs, l'altération de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale due à l'augmentation des concentrations intracellulaires en AG, contribue fortement au mécanisme de stéatose hépatique. En effet, cela entraîne l'accumulation de DAG et/ou de céramides et de l'IR hépatique, ce qui peut également engendrer une accumulation excessive de ROS. De plus, la diminution de la capacité oxydative de la chaîne de transport d'électrons (ETC) pourrait également conduire à un état de « fuite d'électrons », modifiant le flux normal d'électrons, se liant à l'oxygène pour produire des ROS. Par la suite, l'augmentation de la production de ROS favorise l'oxydation des lipides membranaires, des protéines et de l'ADN, les rendant délétères, ce qui nuit à la biogenèse mitochondriale, et active également les voies de signalisation impliquées dans l'inflammation c-Jun N-terminal kinase (JNK) et nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Le stress oxydatif, causé par un déséquilibre entre la production de ROS et les enzymes antioxydantes (glutathion peroxydase,

superoxyde dismutase et catalase dont le niveau d'expression est diminué dans la MASH), active les cellules de Kupffer et les cellules stellaires qui vont libérer des cytokines pro-inflammatoires, vont conduire à l'apoptose et vont participer au développement de la fibrose hépatique. Il a été montré que, via le déclenchement d'une inflammation, le stress oxydatif est un médiateur important dans le syndrome métabolique et dans la progression de la MASLD vers la MASH. Pour finir, chez les patients atteints de MASH, une activité accrue du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), une source microsomale importante de ROS, a été observée, favorisant les phénomènes d'oxydation dans les hépatocytes<sup>29</sup>.

### ***E. Stress du RE***

Il est connu que le stress du RE, conduisant à l'activation de l'unfolded protein response (UPR), joue un rôle important dans le développement de la MASLD/MASH. Dans un premier temps, le stress du RE peut conduire à une altération du métabolisme des lipides et au développement de stéatose hépatique via des voies de signalisation impliquées dans l'UPR telles que la voie de l'immunoglobulin-regulated enhancer 1 (IRE1), la protéine kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) et la voie de l'activating transcription factor 6 (ATF6). De plus, il est suggéré que le stress du RE contribue au développement de l'IR hépatique qui est elle-même impliquée dans la MASLD. Le stress du RE est lié également au développement de l'inflammation notamment à cause de la génération de ROS et d'un stress oxydatif comme observé lors d'une dysfonction mitochondriale. De plus, l'UPR peut également activer les voies de signalisation JNK et NF-κB induisant alors la production de cytokines pro-inflammatoires, et induire la production de protéines impliquées dans la réponse inflammatoire aigüe telles que la c-reactive protein (CRP). Par ailleurs il a été montré que l'activation des 3 voies de signalisation IRE1, PERK et ATF6, induit la synthèse de CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) qui, avec JNK, régule l'expression de la famille de protéines apoptotiques B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), suggérant que le stress du RE contribue au développement de la MASH via l'apoptose. Pour finir, la lumière du RE est un lieu majeur de stockage du calcium intracellulaire et il est important de maintenir une homéostasie calcique pour assurer les fonctions du RE. L'accumulation de lipides conduisant à une lipotoxicité peut être responsable d'une dérégulation de cette homéostasie calcique, ce qui entraîne un stress du RE pouvant conduire à l'apoptose de l'hépatocyte. De plus, comme le RE peut être en contact physique avec les mitochondries, cette perturbation de l'homéostasie calcique peut

induire une accumulation de calcium dans les mitochondries perturbant la perméabilité de leur membrane activant alors des voies de signalisation pro-apoptotiques<sup>30</sup>.

### ***F. Microbiome***

Un facteur de risque supplémentaire pour la MASLD pourrait être l'évolution du microbiome humain dans le temps, qui se caractérise par les changements de régimes alimentaires avec une alimentation riche en fructose, en saccharose et en graisses saturées, l'utilisation massive d'antibiotiques chez les animaux d'élevage et la prescription inconsidérée d'antibiotiques chez l'Homme. Des études pré-cliniques chez la souris ont montré qu'il était possible de reproduire un phénotype MASH par le biais du microbiome. Par ailleurs, le microbiome intestinal des patients atteints de MASH est moins complexe que celui des sujets sains. Plusieurs mécanismes impliqués dans le lien entre un microbiome altéré et la stéatose hépatique sont suggérés. Un microbiome altéré, c'est-à-dire une dysbiose, peut entraîner une perméabilité intestinale accrue, conduisant à une absorption accrue d'AG, ce qui corrèle avec la sévérité de la stéatose chez les patients atteints de MASLD. De plus, cette perméabilité excessive peut conduire à une exposition anormale du foie aux bactéries et leurs produits comme les endotoxines. De cette manière, les protéines bactériennes peuvent fonctionner comme des ligands pour les récepteurs couplés aux protéines G et/ou l'activité des bactéries intestinales modulent l'axe intestin-foie par la signalisation FXR intestinale et la libération de FGF19, une hormone intestinale qui régule la synthèse des acides biliaires ainsi que le métabolisme des lipides et du glucose. Par ailleurs, il a également été montré que les patients MASH présentent plus de bactéries productrices d'alcool au sein de leur microbiote ce qui contribuerait à la génération de ROS au niveau du foie et de ce fait, à l'inflammation<sup>25,31</sup>.

### **IV. Diagnostic de la MASLD**

Il est important de noter qu'il est difficile d'établir un diagnostic de MASLD car les patients sont en général asymptomatiques. Dans la plupart des cas, la MASLD est découverte au cours d'un bilan chez des patients présentant des facteurs de risque ou non, grâce à l'imagerie avec présence de stéatose hépatique, à une cytolyse hépatique avec la mesure des taux plasmatiques de transaminases et à une hyperferritinémie. De plus, comme la MASLD est associée à un métabolisme altéré et à l'IR, l'accumulation des critères du syndrome métabolique (notamment un IMC élevé et une dyslipidémie) ainsi que le degré d'IR évalué par

l'indice Homeostasis Model Assessment (HOMA), sont à prendre en compte lors de l'évaluation de la MASLD.

### **A. Diagnostic invasif de la MASLD : ponction-biopsie hépatique**

A l'heure actuelle, la méthode de référence pour le diagnostic de la MASLD reste l'examen histologique par ponction-biopsie hépatique afin d'évaluer la sévérité de la pathologie (stéatose, inflammation, ballooning, fibrose) grâce à l'utilisation de systèmes de notations.

Le premier système de notation pour l'évaluation de la MASLD a été proposé en **1999 par Brunt** grâce à 51 biopsies de foie de patients MASH<sup>32</sup>. Chaque biopsie a été analysée par un seul pathologiste avec des coupes colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E), à l'acide périodique Schiff (PAS) pour évaluer inflammation, au trichrome de Masson pour évaluer la fibrose, à l'argent de Gordon et Sweet pour mettre en évidence les fibres de réticuline et le changement morphologiques des cellules, et au bleu de Prusse Perls pour évaluer le stockage de fer. De cette manière, la stéatose hépatique a été classée avec un score de 0 à 3 en fonction du pourcentage d'hépatocytes stéatosés dans la biopsie (0 = aucun, 1 = jusqu'à 33 %, 2 = de 33 à 66 %, 3 = plus de 66 %). L'inflammation a également été classée avec un score de 0 à 3 sur la base du nombre de foyers inflammatoires sur un champ observé avec un objectif 200X (0 = 0 foyer/champ, 1 = 1 à 2 foyer(s)/champ, 2 = jusqu'à 4 foyers/champ, 3 = plus de 4 foyers / champ) et le ballooning a été évalué en fonction de sa localisation et de sa sévérité (légère, marquée) sur la base du nombre d'hépatocytes balloonés (**Tableau 2**) :

- ✓ Le **grade 1 (minime)** avec une stéatose hépatique <66%, peu de ballooning, pas ou peu d'inflammation portale et lobulaire (petits amas de leucocytes avec ou sans lymphocytes dispersés).
- Le **grade 2 (modéré)** avec une stéatose hépatique >33%, la présence de ballooning, une inflammation lobulaire plus marquée et une inflammation portale légère ou modérée.
- Le **grade 3 (sévère)** avec une stéatose hépatique >66%, la présence de ballooning marquée, une inflammation lobulaire plus importante que le grade 2 et une inflammation portale identique au grade 2.

Grade	Stéatose	Inflammation	Ballooning
<b>1 (Minime)</b>	1-2	1-2 lobulaire ; 0-1 portale	Minime
<b>2 (Modéré)</b>	2-3	2 lobulaire ; 1-2 portale	Présent
<b>3 (Sévère)</b>	3	3 lobulaire ; 1-2 portale	Marqué

*Tableau 2 : Classification histologique de la MASH selon Brunt et al., 1999<sup>32</sup>*

En parallèle, ce système de scoring permet également d'évaluer la sévérité de la fibrose hépatique avec un score allant de 0 à 4 :

- **Stade 0** : pas de fibrose
- **Stade 1** : présence de fibrose péri-sinusoidale
- **Stade 2** : présence de fibrose péri-sinusoidale avec une fibrose péri-portale
- **Stade 3** : présence de fibrose péri-sinusoidale avec une fibrose péri-portale et du pontage
- **Stade 4** : cirrhose

Cependant, ce score a été développé pour l'évaluation de la MASH et n'englobe pas tous les stades de MASLD. Il ne permet également pas d'évaluer la MASLD pédiatrique qui peut être différente des adultes d'un point de vue histologique.

C'est pourquoi, en **2005**, un autre système de notation est proposé par **Kleiner et Brunt** : le score d'activité NAFLD (NAFLD activity score, NAS)<sup>33</sup>. Il comprend 14 caractéristiques histologiques, dont 4 qui ont été évaluées de manière semi-quantitative : stéatose, inflammation lobulaire, ballooning des hépatocytes et fibrose (**Tableau 3**). La stéatose est évaluée de 0 à 3 avec 0 = <5% d'hépatocytes stéatosés, 1 = 5-33%, 2 = 33-66%, 3 >66%. L'inflammation est également évaluée avec un score de 0-3 en fonction du nombre de foyers inflammatoires sur un champ observé avec un objectif 200x, avec 0 = pas de foyer, 1 = <2 foyers, 2 = 2-4 foyers, 3 >4 foyers. Le ballooning lui est évalué avec un score allant de 0 à 2 avec 0 = pas de ballooning, 1 = quelques cellules en ballooning, 2 = beaucoup de cellules/ballooning marqué. Le NAS correspond à la somme non-pondérée de ces scores de stéatose, d'inflammation et de ballooning, variant donc entre 0 et 8. Les cas avec un NAS de 0 à 2 sont considérés comme MASH. Par ailleurs, la plupart des cas avec des scores ≥5 ont été diagnostiqués comme MASH.

Grade	Stéatose (%)	Inflammation	Ballooning
0	<5	Pas de foyers	Pas de ballooning
1	5-33	<2 foyers/champ (x200)	Peu de ballooning
2	33-66	2-4 foyers/champ (x200)	Ballooning marqué
3	>66%	>4 foyers/champ (x200)	N/A

**Tableau 3 : Évaluation histologique de la MASLD selon Kleiner et al., 2005<sup>33</sup>**

La fibrose, qui est à la fois peu réversible et généralement considérée comme le résultat de l'activité de la maladie, n'est pas incluse comme composante du score d'activité et est évaluée séparément avec un score allant de 0 à 4 :

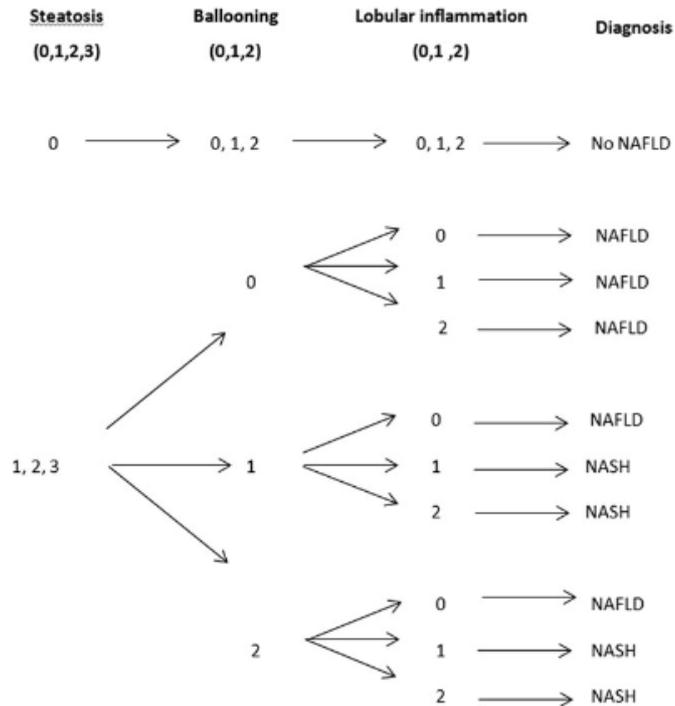
- **Score 0** : pas de fibrose
- **Score 1A** : peu de fibrose péri-sinusoïdale
- **Score 1B** : fibrose péri-sinusoïdale modérée
- **Score 1C** : présence fibrose péri-portale
- **Score 2** : présence de fibrose péri-sinusoïdale et péri-portale
- **Score 3** : fibrose avec pontage
- **Score 4** : cirrhose

Lors de cette évaluation histologique, d'autres paramètres sont évalués et associés à la MASLD tels que les mégamitochondries ou encore les corps de Mallory. Malgré tout, ce score NAS n'est pas utilisé comme un outil de diagnostic mais plutôt comme un système d'évaluation de l'activité. En effet, en mesurant séparément la fibrose, la MASH est différenciée de la MASLD seulement par la présence de ballooning et d'inflammation lobulaire (c'est-à-dire l'activité hépatique). De plus, il existe une zone d'ombre sur la classification des patients avec un score NAS entre 2 et 4 en patients MASH ou non MASH.

En **2012**, **Bedossa P et al.** ont proposé un nouveau système de scoring pour l'évaluation de la sévérité de la MASLD : le score Stéatose, Activité, Fibrose (SAF)<sup>34</sup>. Toutes les biopsies de foie ont été colorées au minimum avec l'H&E, du rouge Sirius (fibrose), et la coloration de Perls (bleu de Prusse pour mettre en évidence le stockage de fer). Le score de stéatose (S) évalue de 0 à 3 les quantités de gouttelettes lipidiques (S<sub>0</sub>:<5% ; S<sub>1</sub>:5%-33% ; S<sub>2</sub>:34%-66% ; S<sub>3</sub>:>66%) et correspond au même grade de stéatose utilisé pour calculer le NAS. Le degré d'activité (A, de

0 à 4) correspond à l'addition non pondérée du ballooning (0 à 2) et de l'inflammation lobulaire (0 à 2). Les foyers inflammatoires ont été évalués sur des champs observés avec un grossissement 20x. Un score de 0 correspond à l'absence de foyers inflammatoires, un score de 1 correspond à  $\leq 2$  foyers inflammatoires et un score de 2 correspond à  $> 2$  foyers inflammatoires. Concernant le ballooning, un score de 0 correspond à la présence d'hépatocytes normaux avec une forme polyédrique et un cytoplasme éosinophile rose, un score de 1 correspond à la présence d'amas d'hépatocytes avec une forme arrondie, un cytoplasme pâle généralement réticulé et dont la taille est similaire aux hépatocytes normaux, et un score de 2 correspond au score 1 avec la présence d'hépatocytes élargis deux fois plus grands que les hépatocytes normaux. Ceci représente un avantage par rapport aux autres systèmes de scoring car Bedossa propose des caractéristiques visuelles quant à la taille et à la forme des hépatocytes afin de mieux reconnaître et quantifier le ballooning qui est, en temps normal, la caractéristique la plus difficile à identifier histologiquement. Cette évaluation de l'activité constitue une différence entre le NAS et le SAF. En effet, le SAF permet d'évaluer le ballooning et l'inflammation sur la même échelle de 0 à 2, tandis que le NAS évalue l'inflammation (0-3) et le ballooning (0-2) sur des échelles différentes. Par ailleurs, tout comme la stéatose, les stades de fibrose ont été évalués de la même manière que le score décrit par Kleiner en 2005 (stade 0 ( $F_0$ ) : aucun) ; stade 1 ( $F_1$ ) : 1a ou 1b zone péri-sinusoïdale ou 1c fibrose portale ; stade 2 ( $F_2$ ) : fibrose péri-sinusoïdale et péri-portale sans pontage ; stade 3 ( $F_3$ ) : fibrose avec pontage et stade 4 ( $F_4$ ) : cirrhose).

A ce SAF a été associé un algorithme afin de dissocier les patients MASH et les patients MASLD (**Figure 9**). Pour cela, la stéatose a été utilisée comme un critère d'entrée dans l'algorithme, à laquelle il a été ajouté le ballooning et l'inflammation. Grâce à cet algorithme, les patients avec un score minimal de 1 dans les trois caractéristiques (stéatose, inflammation, ballooning) sont catégorisés comme MASH.



*Figure 9 : Algorithme de diagnostic pour la MASH selon Bedossa et al., 2012<sup>34</sup>*

Ce score SAF représente une manière simplifiée et pratique de décrire séparément les principales caractéristiques histopathologiques de la MASLD. En outre, il permet d'identifier des sous-groupes particuliers de patients difficiles à classer, tels que ceux qui présentent une stéatose et une fibrose péri-sinusoïdale, mais pas de ballooning ni d'inflammation lobulaire ou ceux qui présentent une inflammation et du ballooning, mais pas de stéatose. Par contre, ce score SAF ne prend pas en compte un modèle plus complexe de la MASH et l'identification d'autres caractéristiques telles que les corps apoptotiques ou les corps de Mallory.

### ***B. Diagnostic non invasif de la MASLD : biologie et imagerie***

La biopsie du foie présente tout de même quelques inconvénients. En effet, c'est une technique invasive pour le patient pouvant induire des douleurs et des complications telles que des hémorragies, et, de plus, elle ne représente pas toujours l'ensemble du foie. Dans ce contexte, il est important de proposer des alternatives non invasives de diagnostic de MASLD. Les biomarqueurs actuellement utilisés comprennent deux catégories : les biomarqueurs plasmatiques et les biomarqueurs d'imagerie.

## 1. Biomarqueurs plasmatiques de stéatose

Classiquement, le dosage sérique des enzymes hépatiques transaminases (ALT, AST) et de la gamma-glutamyltransférase (GGT) rentre en compte dans le diagnostic de la MASLD. Cependant, des concentrations anormales de ces marqueurs plasmatiques ne sont pas spécifiques à la MASLD et témoignent plutôt d'une atteinte hépatique générale. De plus, il est parfois possible que ces marqueurs ne soient pas modifiés chez certains patients atteints de MASLD, ne reflétant pas la gravité histologique. C'est pourquoi des scores non invasifs pour la stéatose ont été mis au point, combinant plusieurs paramètres (**Tableau 4**).

SCORE	PARAMETRES
<b>Fatty liver index (FLI)</b>	IMC, tour de taille, TG et GGT
<b>Hepatic steatosis index (HSI)</b>	IMC, ratio ALT/AST, présence diabète et sexe
<b>NAFLD liver fat score (NLFS)</b>	ALT et AST, présence syndrome métabolique et DT2, et insuline
<b>Lipid accumulation product (LAP)</b>	Tour de taille, TG (seuil spécifique au sexe)

*Tableau 4 : Scores non invasifs utilisés dans le diagnostic de la stéatose hépatique*

De manière générale, ces tests permettent de donner une idée sur la gravité de la stéatose hépatique. Bien qu'ils soient simples et facile à utiliser, ils manquent souvent de précision et de résolution. De cette manière, les résultats obtenus avec ce type de tests doivent être complétés par des techniques plus évoluées notamment par exemple par l'imagerie. De plus, ces tests ne permettent d'évaluer que la stéatose hépatique et ne donnent aucune information sur la fibrose<sup>27</sup>.

## 2. Scores non invasifs de fibrose

Tout comme la stéatose, des tests non invasifs basés sur des paramètres plasmatiques ont également été développés afin d'évaluer la fibrose hépatique. Ces scores prennent en compte des biomarqueurs directs de la fibrogénèse et/ou de la fibrinolyse. Parmi ces biomarqueurs, on retrouve l'acide hyaluronique (HA) qui joue un rôle structural dans la formation de la matrice extracellulaire ; la laminine, un autre constituant majeur de la matrice extracellulaire en plus du collagène ; le type III procollagen amino terminal propeptide (PIIINP) et pro-C3, tous

les deux à l'origine de la synthèse de collagène ; le tissu inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) et les métalloprotéinases (MMP) 1 et 2 qui régulent la dégradation et la formation de matrice extracellulaire. Cependant, il n'est pas conseillé d'utiliser ces biomarqueurs seuls, c'est pourquoi ils sont souvent combinés dans des tests plus complexes afin d'évaluer la sévérité de la fibrose hépatique<sup>35,36</sup> (**Tableau 5**).

SCORE	PARAMETRES
<b>AST-to-platelet ratio, APRI</b>	AST et contenu plaquettaire
<b>Score fibrosis-4, FIB-4</b>	AST, ALT, contenu plaquettaire et âge
<b>NAFLD fibrosis score, NFS</b>	AST, ALT, contenu plaquettaire, âge, IMC, albumine et glycémie/diabète
<b>Score BARD</b>	ratio AST/ALT, IMC, diabète
<b>Enhanced Liver Fibrosis<sup>®</sup>, ELF<sup>®</sup></b>	<i>TIMP-1, PIIINP et HA</i>
<b>FibroTest<sup>®</sup></b>	ALT, $\alpha$ 2-macroglobuline, haptoglobine, apolipoprotéine A1, bilirubine et GGT
<b>Fibromètre<sup>®</sup></b>	<i>AST, ALT, contenu plaquettaire, âge, poids, glucose et ferritine</i>
<b>Hepascore</b>	âge, HA, $\alpha$ 2-macroglobuline, bilirubine, GGT et sexe

**Tableau 5 : Scores non invasifs utilisés dans le diagnostic de la fibrose hépatique**

La thrombospondine 2 (TSP-2) est une glycoprotéine qui interagit avec les protéines structurelles de la matrice extracellulaire, les récepteurs cellulaires, les facteurs de croissance et les cytokines. Il a été montré que les niveaux sériques de TSP-2 sont modérément corrélés avec le degré de ballooning et de fibrose, et représentent un marqueur moléculaire potentiel pour le diagnostic clinique de la MASH et de la fibrose<sup>37-39</sup>. Il a également été montré que la cytokératine-18 (CK-18) pouvait être un biomarqueur de MASH. Cette CK-18 est clivée par la caspase-3 lors de l'apoptose des hépatocytes que l'on retrouve au cours du processus physiopathologique de la MASH, produisant ainsi des fragments de CK-18 qui peuvent être détectés dans la circulation sanguine<sup>35,40</sup>.

### **3. Biomarqueurs d'imagerie**

En général, les biomarqueurs ne sont pas tous strictement spécifiques au foie et il faut donc tenir compte de la présence ou de l'absence d'autres pathologies. Toutefois, ces limites peuvent être partiellement contrecarrées grâce aux outils d'imagerie permettant d'évaluer la stéatose et la fibrose hépatique, tels que les outils de diagnostic basés sur la résonance magnétique et les ultrasons qui peuvent révéler les propriétés intrinsèques de texture et/ou de rigidité du foie. Parmi ces techniques, on retrouve l'échographie de routine (ou ultrasonographie) qui est l'approche diagnostique la plus utilisée pour évaluer la stéatose hépatique en raison de sa facilité d'utilisation, de son faible coût et de son efficacité. Tout comme l'échographie, la tomographie (scanner), qui utilise les rayons X, est largement accessible, facile à réaliser et précise dans le diagnostic de la stéatose. Elle est d'ailleurs plus sensible et plus spécifique que l'échographie pour diagnostiquer la MASLD. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet de quantifier les quantités de graisse hépatique (en détectant à la fois la graisse et l'eau) avec une résolution élevée et sans radiation. Plusieurs techniques d'IRM différentes ont été développées. Parmi elles, on trouve la spectroscopie par résonance magnétique (SRM) et l'IRM-proton density fat fraction (IRM-PDFF) qui est un outil de diagnostic plus avancé. L'IRM-PDFF a été validé en comparaison à la biopsie du foie et à l'histologie et est actuellement utilisé dans de nombreux essais cliniques sur la MASH<sup>35</sup>.

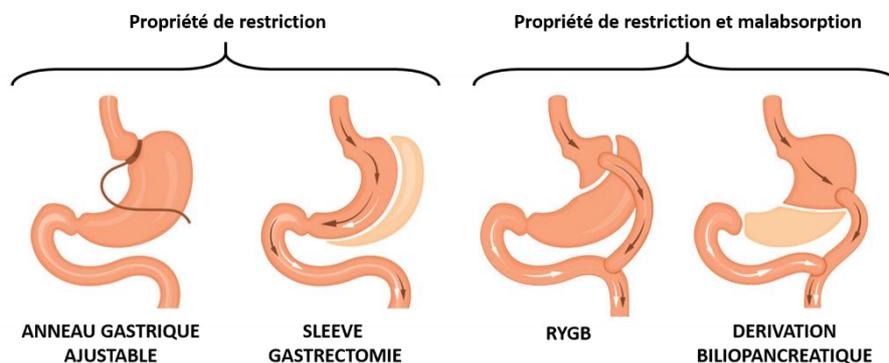
Les techniques d'imagerie décrites ci-dessus permettent seulement de détecter la stéatose hépatique chez les patients MASLD et ne permettent pas de visualiser la fibrose. Pour évaluer la fibrose hépatique, il est également possible d'utiliser des techniques d'imagerie. Dans un premier temps, on trouve les techniques d'élastométrie telles que le FibroScan<sup>®</sup>, mais également certaines techniques basées sur l'IRM. En effet, le FibroScan<sup>®</sup> est une technique d'élastométrie impulsionnelle permettant d'évaluer la rigidité du foie qui a été décrite pour la première fois en France pour le diagnostic de la fibrose hépatique<sup>41</sup>. Le FibroScan<sup>®</sup> est une bonne alternative à la biopsie hépatique et il semble assez performant pour différencier la MASH d'une simple stéatose. L'élastographie par résonance magnétique (MRE, Magnetic resonance elastography) est une technique basée sur l'IRM plus précise que le FibroScan<sup>®</sup> et moins sensible à l'obésité<sup>35</sup>.

## V. Traitements de la MASLD

### A. *Modifications du mode de vie et perte de poids*

Optimiser le mode de vie via une intervention sur le régime alimentaire, une activité physique et un arrêt dans la consommation de tabac/alcool est la base dans le traitement de la MASLD. Depuis quelques années, une perte de poids de 7 à 10% (minimum 5%) est recommandée. En effet, plusieurs études cliniques ont révélé qu'une perte de poids supérieur à 7% permettait d'améliorer au niveau histologique, la stéatose, l'inflammation et le ballooning ainsi que le score NAS. De plus, il a été montré que chez les patients avec une perte de poids supérieure ou égal à 10%, la réduction du score NAS, de la MASH et de la fibrose était plus importante que chez les autres patients avec une perte de poids supérieure ou égale à 5%<sup>42</sup>.

- **La chirurgie bariatrique** peut être une option pour les patients obèses avec MASLD ne répondant pas aux modifications du mode de vie et dans l'incapacité de perdre du poids. Il existe deux types de chirurgies bariatriques : celles qui permettent de réduire la taille de l'estomac, comme la pose d'un anneau gastrique ajustable et la sleeve gastrectomie, et celles qui permettent à la fois de réduire la taille de l'estomac et de réduire l'absorption des aliments par l'organisme en court-circuitant une partie de l'intestin, telles que le RYGB (Roux-en-Y gastric bypass) et la dérivation biliopancréatique (**Figure 10**). Un an après l'opération, la chirurgie bariatrique permet d'améliorer la stéatose, l'inflammation et la ballooning hépatique entraînant la régression de la MASH chez environ 85% des patients opérés<sup>43</sup>. De plus, elle permet également d'améliorer la fibrose. Il semblerait d'ailleurs que le RYGB soit plus efficace pour améliorer la MASLD que l'anneau gastrique ou la gastrectomie<sup>44,45</sup>.



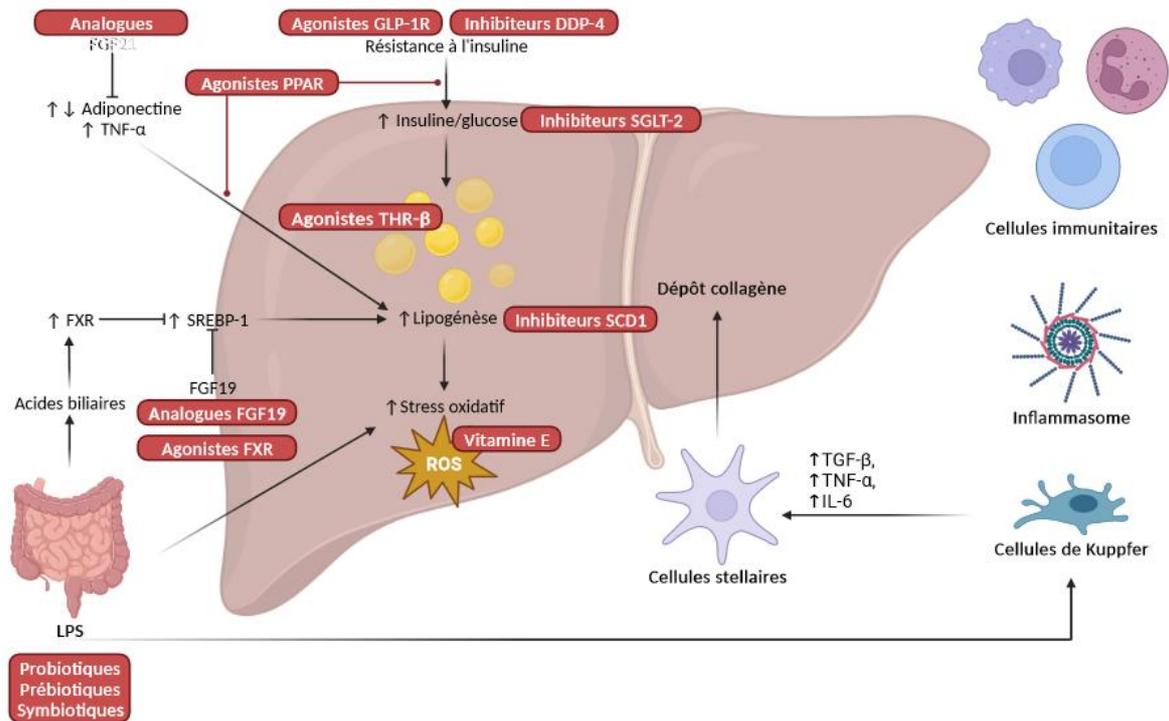
**Figure 10 : Représentation schématique des différentes techniques de chirurgie bariatrique**

Par ailleurs, comme toute intervention chirurgicale, la chirurgie bariatrique peut entraîner des complications post-opératoires et n'est pas toujours efficace. De plus, cette chirurgie est opérée chez des individus obèses avec un IMC élevé, cependant certains patients MASLD sont non-obèses et minces et ne peuvent pas y avoir recours. En effet, entre 10-15% des patients MASLD présentent un poids normal et sont considérés comme non-obèses ou minces<sup>46</sup>. C'est pourquoi le développement de nouvelles molécules pour le traitement de la MASLD constitue un enjeu important.

- **La vitamine E** (Vit E) possède des propriétés antioxydantes et pourrait être bénéfique dans le traitement de la MASLD par son action sur le stress oxydatif et la synthèse de ROS. Des analyses ont suggéré qu'une augmentation de l'apport alimentaire en vitamine E protège contre la MASLD, en particulier chez les personnes atteintes de DT2<sup>47</sup>. Dans l'étude clinique Pioglitazone vs Vitamin E vs Placebo for Treatment of Non-Diabetic Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis (PIVENS), la vit E a permis d'améliorer la stéatose, l'inflammation et le ballooning (mais pas la fibrose) chez des patients MASH non diabétiques ainsi que les niveaux d'enzymes hépatiques<sup>48</sup>. De plus, quelques études ont montré une réduction des enzymes hépatiques mais il n'y a pas de données claires sur l'amélioration de la fibrose<sup>49</sup> et aucune étude clinique de phase III n'a été réalisée. De plus, l'utilisation de la vit E à forte dose pourrait être associée à un risque accru d'accident vasculaire cérébral (AVC) hémorragique et à une potentielle augmentation du cancer de la prostate chez les hommes de plus de 50 ans, laissant planer le doute sur son innocuité à long terme<sup>50</sup>.

### ***B. Traitements médicamenteux approuvés dans la MASLD***

Jusqu'à cette année, aucun traitement pharmacologique n'était approuvé en raison de la complexité de la pathophysiologie de la MASLD. Plusieurs médicaments ciblant plusieurs mécanismes physiopathologiques impliqués dans la pathogénèse de la MASLD sont actuellement à un stade avancé de développement (**Figure 11**) et très récemment la Food and Drug Administration (FDA) a autorisé la mise sur le marché du resmetirom, un agoniste sélectif du récepteur aux hormones thyroïdiennes  $\beta$  (Thyroid Hormone Receptor  $\beta$ , THR- $\beta$ ) pour le traitement de la MASLD.



**Figure 11 : Voies de signalisation ciblées dans le traitement de la MASLD, d'après Yin et al., 2023<sup>27</sup>**

Plusieurs études suggèrent que l'incidence d'hypothyroïdie est plus élevée chez les patients MASLD/MASH<sup>51</sup>. Il a également été montré que les hormones thyroïdiennes jouent un rôle important dans la LDN, la  $\beta$ -oxydation des AGs, le métabolisme du cholestérol et le métabolisme des carbohydrates via leur récepteur THR- $\beta$ <sup>52</sup>. Elles inhibent également la fibrogénèse via la voie de signalisation du transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>53</sup>. Le **resmetirom (MGL-3196)** est une agoniste THR- $\beta$  qui cible le foie<sup>54</sup> et qui a récemment montré que, à différentes doses, il améliorerait le développement de la MASH ainsi que la fibrose chez des patients avec une MASH confirmée par biopsie et de la fibrose (étude clinique de Phase III MAESTRO-NASH)<sup>55</sup>. Les résultats positifs de cette étude ont accéléré le développement de cette molécule et ont conduit à son autorisation de mise sur le marché par la FDA pour le traitement de la MASH en mars 2024, faisant du resmetirom le premier traitement disponible sur le marché pour cette pathologie. MAESTRO-NASH se poursuit afin de déterminer si un traitement plus long permet d'améliorer les paramètres cliniques, notamment la fibrose.

### **C. Traitements médicamenteux en évaluation dans la MASLD**

#### **1. Molécules utilisées pour le traitement du diabète de type II**

Même si la pathogénèse de la MASLD reste encore peu claire, l'IR joue un rôle clé dans le développement de la MASLD. De plus, la prévalence de la MASLD est très importante chez les patients atteints de DT2 (environ 50%)<sup>18</sup>. C'est pourquoi, des molécules anti-DT2 sont souvent utilisées pour le traitement des patients atteints de DT2 avec MASLD.

##### **- Les thiazolidinediones**

Les thiazolidinediones agissent comme des agonistes du PPAR $\gamma$ , un récepteur nucléaire majoritairement exprimé dans le tissu adipeux qui joue un rôle important dans la différenciation des adipocytes et dans le métabolisme du glucose et des lipides<sup>56</sup>. C'est pourquoi les thiazolidinediones améliorent l'IR et le métabolisme des lipides et du glucose chez les patients diabétiques. Parmi ces thiazolidinediones, on trouve principalement la **pioglitazone** qui a montré une amélioration des caractéristiques histologiques de la MASH (sans effet sur la fibrose) dans de nombreuses études cliniques<sup>48,57-59</sup>. Cependant, la pioglitazone présente des effets secondaires importants (prise de poids, œdème du pied, anémie, ostéoporose chez les femmes ménopausées et potentiel risque de cancer de la vessie) ce qui a limité son développement dans le traitement de la MASLD<sup>60</sup>. De plus, bien que les thiazolidinediones puissent améliorer certains facteurs de risque cardiovasculaire, d'autres médicaments, tels que les inhibiteurs du sodium-glucose cotransporteur-2 (SGLT-2) et les agonistes du récepteur glucagon-like peptide 1 (GLP-1) (GLP1-R), sont privilégiés en raison de leur capacité à induire une perte de poids tout en réduisant la mortalité cardiovasculaire.

##### **- Les agonistes du GLP1-R (GLP1-RA)**

Le GLP-1 est une incrétine, c'est-à-dire une hormone intestinale libérée par les cellules de la muqueuse intestinale en réponse à une consommation alimentaire. En réponse au glucose, le GLP-1 stimule la sécrétion d'insuline et inhibe la sécrétion de glucagon et la production hépatique de glucose. Plusieurs GLP-1RA, simple et double, sont autorisés pour le traitement du DT2 et de l'obésité<sup>61</sup>. Dans l'étude clinique de phase II Liraglutide Safety and Efficacy in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis (LEAN), le **liraglutide** s'est révélé non toxique, bien toléré et a conduit à une résolution histologique de la MASH chez 39% des patients traités (vs 9% avec le placebo) ainsi qu'à une amélioration de la fibrose hépatique<sup>62</sup>. Le **semaglutide**, un

autre agoniste GLP-1R, permet également d'améliorer la MASH après 72 semaines de traitement, sans différence significative sur la fibrose<sup>63,64</sup>. Le semaglutide a été testé chez des patients MASLD en combinaison avec des inhibiteurs de la lipogénèse qui semblent apporter des effets bénéfiques additionnels<sup>65,66</sup>. Ces molécules présentent tout de même quelques effets secondaires notamment des complications gastrointestinales (diarrhées, nausées, vomissements, constipation, perte d'appétit, etc)<sup>27</sup>.

Par ailleurs, d'autres médicaments en combinaison sont également disponibles et permettraient d'améliorer la MASLD et la MASH. Parmi eux, on trouve le **tirzepatide**, un double agoniste du GLP-1R et du récepteur au glucose-dépendent insulino-tropique polypeptide (GIP) (GIPR), le **survodutide**, **cotadutide** et l'**efinopégdutide**, des doubles agonistes du GLP-1R et du récepteur au glucagon et la molécule **AMG-133** (aussi connu sous le nom de maridebart/cafraglutide), un anticorps antagoniste du GIPR combiné à des peptides agonistes analogues du GLP-1. Dans une étude clinique de Phase II, le tirzepatide<sup>67</sup> et le survodutide<sup>68</sup> ont récemment amélioré la MASH sans aggravation de fibrose. Le cotadutide et l'efinopégdutide ont également montré qu'ils amélioreraient la stéatose hépatique, les enzymes hépatiques et les indices de fibrose chez les personnes atteintes de MASLD<sup>69,70</sup>. Dans une étude clinique de phase I, l'AMG-133 a permis de diminuer le poids de patients obèses de manière dose-dépendante ce qui semble prometteur pour la prise en charge de la MASLD et supporte la poursuite de son évaluation<sup>71</sup>. Il existe également des triples agonistes du GLP-1R, GIPR et du récepteur au glucagon tels que le **retatrutide** (LY3437943) qui a déjà montré son efficacité sur la réduction du poids de plusieurs participants<sup>72-74</sup>.

#### - **Les inhibiteurs Sodium Glucose Cotransporter 2 (SGLT-2)**

Les inhibiteurs SGLT-2 (SGLT-2i) sont des molécules orales antidiabétiques qui inhibent la réabsorption du glucose au niveau des reins, diminuant ainsi les concentrations de glucose dans le sang<sup>75</sup>. Il n'existe pas encore d'essais cliniques contrôlés évaluant les effets des SGLT-2i sur l'histologie du foie. Par contre, plusieurs études ont montré que l'administration orale d'**empagliflozine** permet de diminuer les lipides hépatiques chez des patients diabétiques avec ou sans MASLD<sup>76,77</sup>. Plusieurs autres SGLT-2i comme l'**ipragliflozine**<sup>78-82</sup>, le **dapagliflozine**<sup>83-85</sup>, le **licogliflozine**<sup>86</sup> ou le **canagliflozine**<sup>87-98</sup> sont également testés chez des patients diabétiques avec MASLD et ont montré des effets bénéfiques sur le foie. Les SGLT-2i

présentent tout de même des effets secondaires tels que la polyurie ou des infections du système urinaire et génital<sup>99</sup>.

## **2. Modulateurs des récepteurs nucléaires**

### **- Les agonistes Farnesoid X Receptor (FXR)**

Les acides biliaries sont des métabolites du cholestérol synthétisés dans le foie dont le rôle majeur est de faciliter l'absorption intestinale des lipides alimentaires. De plus, les acides biliaries peuvent activer des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides tel que FXR qui régule la synthèse des acides biliaries, le métabolisme des glycolipides, l'inflammation hépatique et le processus de fibrose. Les agonistes FXR améliorent la sensibilité à l'insuline, inhibent la synthèse des acides biliaries et favorisent l'oxydation mitochondriale des AG. Parmi ces agonistes FXR, l'**acide obéticholique (OCA)**, un dérivé d'acide biliaire, a été désigné afin d'augmenter sa puissance par rapport aux acides biliaries endogènes<sup>100</sup>. L'OCA est utilisé en traitement de deuxième intention dans la cholangite biliaire primitive et est actuellement développé dans le traitement de la MASH à une dose plus forte depuis les résultats positifs de l'étude de Phase II Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT) sur l'histologie du foie<sup>101</sup>. Ces résultats ont ensuite été confirmés dans une étude clinique de Phase III où l'OCA a diminué la fibrose et certains marqueurs biochimiques et histologiques de MASH<sup>102</sup>. L'efficacité de l'OCA sur le développement de la MASH et plus particulièrement la fibrose a été confirmée dans l'étude de Phase III REGENERATE<sup>103</sup>. Cependant, des effets secondaires tels que le prurit ou une augmentation du LDL-C ainsi que des inquiétudes sur le rapport bénéfice/risque ont entraîné l'arrêt du développement de l'OCA dans le traitement de la MASH.

Parmi les acides biliaries naturels qui représentent un intérêt potentiel dans le traitement de la MASLD, on retrouve l'**acide ursodésoxycholique (UDCA)** qui semble efficace pour réduire plusieurs marqueurs biochimiques chez des patients MASH mais n'améliore pas l'histologie du foie<sup>104-106</sup>.

### - Les agonistes PPAR

En plus des agonistes PPAR $\gamma$  utilisés comme antidiabétiques, de nombreux agonistes PPAR naturels et synthétiques ont été étudiés pour leur efficacité thérapeutique, y compris des agonistes capables d'activer deux ou trois isoformes de PPAR.

Dans l'essai clinique de phase IIb GOLDEN-505, l'**elafibranor (GFT505)** (co-agoniste PPAR $\alpha/\delta$ ) a engendré une réduction modérée de la MASH<sup>107</sup>. Cependant, dans l'étude plus large RESOLVE-IT de phase III, les résultats de l'analyse intermédiaire ont montré que l'elafibranor ne permet pas de réduire le développement de la MASH<sup>108</sup>. Par ailleurs, une étude clinique de phase IIb a montré que l'utilisation du pan-agoniste PPAR **lanifibranor** (agoniste des trois isoformes de PPAR) améliore de manière dose-dépendante la MASH ainsi que la fibrose chez des patients diabétiques MASH<sup>109</sup>. Une étude de phase III est actuellement en cours pour évaluer le lanifibranor de manière plus spécifique. De plus, il a été montré que le **saroglitazar**, un co-agoniste PPAR $\alpha/\gamma$ , permet de diminuer l'IR, la stéatose hépatique ainsi que certaines enzymes hépatiques<sup>110</sup>. Il est actuellement approuvé et utilisé en Inde dans le traitement du DT2 et de la MASH<sup>111</sup>. Des essais avec cette molécule sont actuellement en cours chez des patients MASH et ont déjà montré une certaine efficacité seul<sup>110,112-115</sup> et plus récemment en combinaison avec la vit E<sup>116</sup>. Pour finir, le **pemafibrate**, un modulateur très puissant et sélectif de PPAR $\alpha$  (Selective PPAR $\alpha$  Modulator, SPPARM $\alpha$ ) semble avoir des effets bénéfiques sur le développement de la MASLD dans de nombreuses études cliniques seul<sup>117-129</sup> et en combinaison avec d'autres médicaments comme les agonistes du GLP-1R<sup>130</sup> ou des inhibiteurs SGLT-2<sup>131</sup>.

### 3. Les analogues des facteurs de croissance des fibroblastes (Fibroblast growth factor, FGF)

FGF19 et FGF21 sont des messagers endocrines qui régulent le métabolisme des lipides et des carbohydrates et participent à l'homéostasie énergétique. Initialement, leurs analogues ont été développés pour diminuer la glycémie chez des patients DT2, mais ils sont désormais considérés comme des nouvelles molécules prometteuses pour le traitement de la MASLD<sup>132</sup>. Dans plusieurs études cliniques, l'**aldafermin (NGM282)**, analogue de FGF19, semble être efficace pour améliorer l'atteinte hépatique chez des patients MASH<sup>133-137</sup>. L'**efruxifermin**<sup>138-</sup>

<sup>141</sup> et le **pegozafermin**<sup>142–144</sup> qui ciblent FGF21 semble eux aussi posséder un potentiel effet bénéfique sur le développement de la MASLD.

#### **4. L'inhibiteur de la stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1)**

Les patients MASH présentent une LDN très importante. Les produits lipotoxiques synthétisés au cours de cette LDN dans le foie contribuent largement à l'inflammation hépatique et à l'apoptose qui, entre autres, caractérisent la MASH<sup>145</sup>. Plusieurs agents en cours de développement inhibent spécifiquement des enzymes clés de la lipogenèse telles que l'acetyl-CoA synthétase (ACS) ou la FAS. La SCD1 est l'enzyme catalysant l'étape limitante de la synthèse des AG monoinsaturés<sup>146</sup>. **L'acide 3 $\beta$ -Arachidyl amido cholanoïque (Aramchol)** est un conjugué oral d'AG et d'acides biliaires ciblant le foie qui inhibe partiellement l'expression de la protéine SCD1 hépatique et réduit les TG hépatiques et la fibrose dans des modèles animaux de MASH ou de fibrose<sup>147,148</sup>. Les résultats de l'étude ARREST ont montré que la modulation de SCD1 par l'aramchol améliore l'histologie de la MASH et de la fibrose<sup>149</sup>, ouvrant la voie à l'essai clinique de phase III ARMOR (NCT04104321).

#### **5. Probiotiques/prébiotiques/symbiotiques**

Depuis quelques années, le microbiome est un sujet de plus en plus étudié dans le traitement de la MASLD. La plupart des études cliniques ont suggéré que cibler le microbiome pourrait avoir un effet bénéfique thérapeutique sur la MASLD<sup>150–152</sup> dont la transplantation<sup>153</sup>.

Bien d'autres molécules, telles que le selonsertib<sup>154</sup> ou le cenicriviroc<sup>155</sup>, n'ont pas réellement prouvé leur efficacité chez l'Homme dans le traitement de la MASLD renforçant l'idée que, malgré les nombreux progrès dans la compréhension de sa physiopathologie, la MASLD reste une maladie complexe et le développement de nouvelles molécules reste encore un long chemin à parcourir. De nouvelles stratégies ont été adoptées pour accélérer le développement de nouvelles molécules notamment grâce à certaines innovations mises en place dans la conception des essais cliniques et les critères d'évaluation et grâce à l'ouverture vers une médecine personnalisée et/ou des approches thérapeutiques combinées<sup>156</sup>.

## **PARTIE 4 : L'ATHÉROSCLÉROSE**

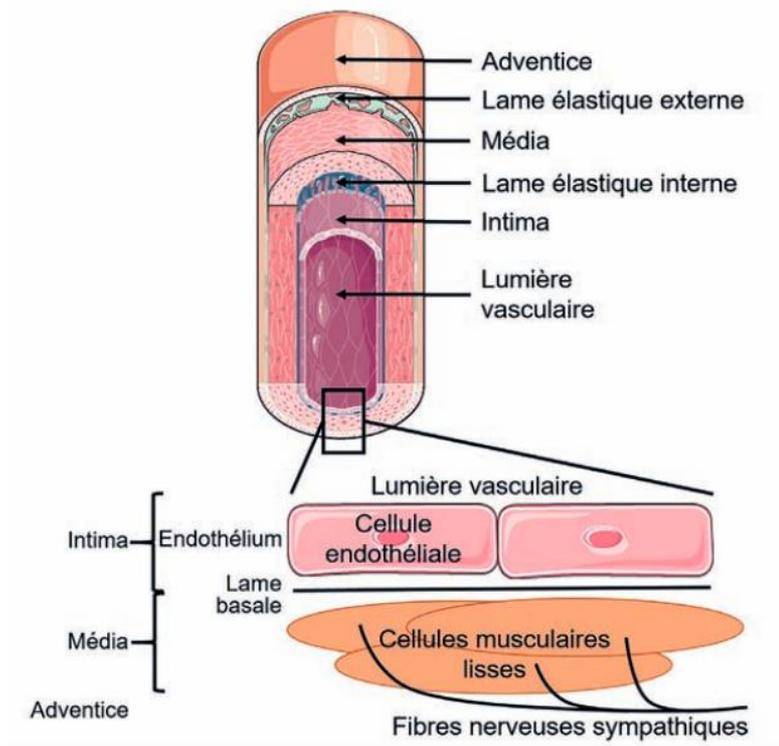
### **I. Généralités**

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), avec environ 17,9 millions de mort par an, les MCV représentent la première cause de mortalité dans le monde. Les MCV regroupent un ensemble de troubles du cœur et des vaisseaux sanguins comme les maladies coronariennes, les maladies cérébrovasculaires, les cardiopathies rhumatismales, les maladies vasculaires périphériques et les maladies hypertensives<sup>157</sup>.

L'athérosclérose, une maladie inflammatoire chronique des vaisseaux de moyen et de large calibre, est à l'origine de la plupart de ces MCV. C'est une pathologie complexe d'évolution lente qui se caractérise par l'accumulation de lipides et/ou de matériel fibreux (athérome) dans la couche la plus interne des artères, l'intima<sup>158</sup>.

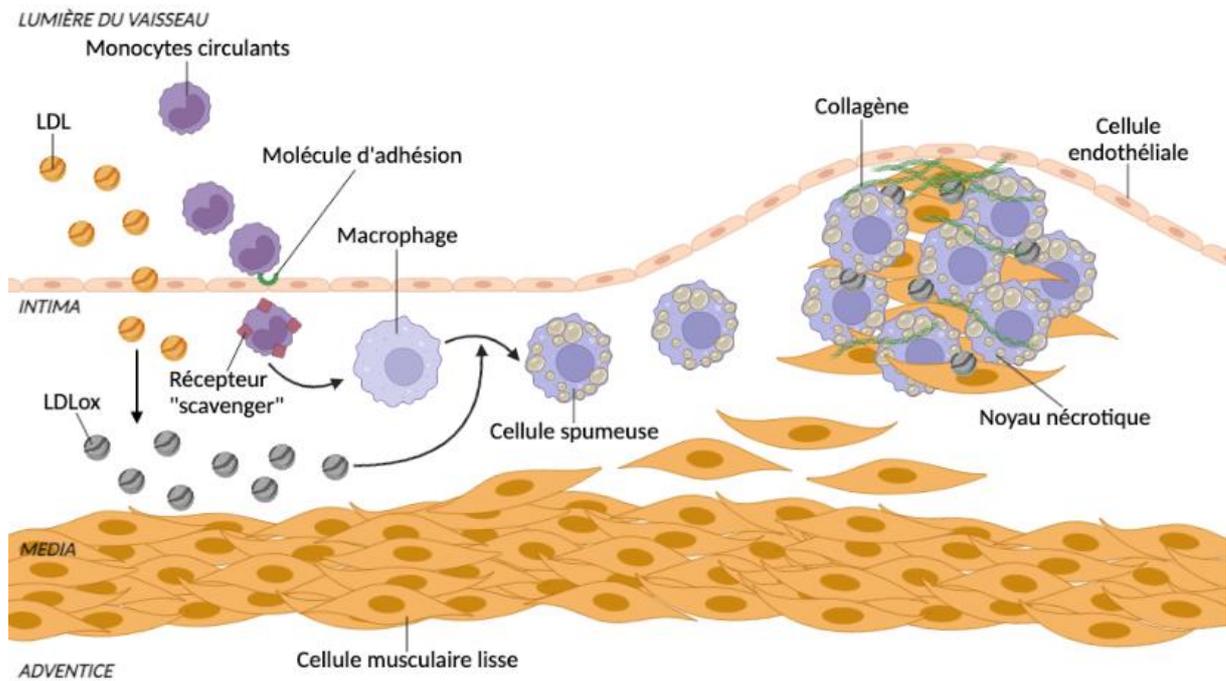
3 couches constituent la paroi des artères, d'où la structure tri-laminaire (**Figure 12**) :

- L'**intima** est la couche la plus interne et la plus fine de la paroi vasculaire. Elle est au contact direct du sang et elle est composée de cellules endothéliales et d'une couche sous-endothéliale correspondant à du tissu conjonctif, séparées par une membrane basale.
- La **média** est la couche moyenne et la couche la plus épaisse de la paroi vasculaire. Elle est majoritairement formée de cellules musculaires lisses (CML). Ces CML sont entourées d'une matrice extracellulaire bien organisée constituée de collagène, d'élastine et d'autres macromolécules.
- L'**adventice** est la couche la plus externe de la paroi vasculaire. Elle est composée de fibres de collagène et de fibres d'élastine. Elle contient des terminaisons nerveuses ainsi que les micro-vaisseaux irriguant la paroi artérielle, les vasa vasorum<sup>159</sup>.



**Figure 12 : Organisation structurelle de la paroi artérielle, d'après Bessaguet et al., 2022<sup>160</sup>**

Le processus athérosclérotique peut être divisé en trois stades successifs : un stade précoce d'initiation de l'athérosclérose caractérisé par une simple accumulation de lipides, d'abord extracellulaire puis intracellulaire, formant alors de simples stries lipidiques. Ces stries lipidiques peuvent évoluer vers une plaque d'athérome plus complexe caractérisée par la formation d'un noyau nécrotique fortement chargé en lipides et en macrophages, en CML, présentant une néovascularisation, et une chape fibreuse qui les séparent de la circulation sanguine ce qui stabilise la plaque. À tout moment, la rupture de la plaque d'athérosclérose ou son érosion peut conduire à la formation d'une thrombose susceptible de provoquer un événement cardiovasculaire tel qu'un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral (AVC)<sup>158</sup> (**Figure 13**).



*Figure 13 : Processus d'évolution de la lésion d'athérosclérose, d'après Libby et al., 2019<sup>158</sup>*

Les lésions d'athérosclérose surviennent généralement dans les zones de courbure de troncs artériels ou les zones de bifurcation, là où le flux sanguin laminaire est perturbé. Les principaux vaisseaux atteints sont les artères coronaires, la carotide, les artères des membres inférieurs et l'aorte<sup>159</sup>.

## **II. Formation de la lésion d'athérosclérose**

### **A. *Initiation de la lésion d'athérosclérose***

Au début de la formation de la plaque d'athérosclérose, les LDL s'accumulent dans l'intima suite à une altération de la fonction de l'endothélium qui constitue l'interface entre le sang et l'intima. Les LDL sont retenues dans l'intima par des interactions électrostatiques entre l'un de leurs constituants, l'apoB, chargée positivement, et les protéoglycanes de la matrice extracellulaire chargés négativement grâce à leur groupe sulfate et acides carboxyliques présents dans leur chaîne de glycosaminoglycanes (GAG). La qualité des LDL, c'est-à-dire leur composition protéique et lipidique, peut influencer la conformation de l'apoB et donc l'interaction des LDL avec les protéoglycanes. Une fois retenues au niveau de l'intima, les LDL peuvent subir des modifications telles que l'oxydation ou la glycation, les rendant hautement athérogènes. L'oxydation des LDL est un processus complexe où lipides et protéines présents dans les LDL sont modifiés conduisant à la formation de LDL oxydées (LDLox). Elles sont

oxydées par les cellules vasculaires, les cellules endothéliales, les CML et les macrophages, présentant des enzymes oxydantes, notamment la lipoxigénase et la myéloperoxydase, la xanthine oxydase ou la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, en présence ou en l'absence d'ions de métaux de transition (fer ou cuivre)<sup>158,159</sup>.

### ***B. Progression de la plaque d'athérosclérose***

L'accumulation des LDLox induit une réponse inflammatoire vasculaire qui se manifeste par l'activation des cellules endothéliales qui vont produire des molécules de chimiotactisme comme la monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) et des molécules d'adhésion comme la vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), l'intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) ou les sélectines. Ces molécules vont permettre le recrutement de monocytes circulants qui vont alors adhérer et pénétrer dans la paroi artérielle où ils vont se différencier en macrophages, qui possèdent un grand pouvoir de phagocytose. Ces macrophages vont exprimer à leur surface des récepteurs « éboueurs » (les scavenger receptors tels que SR-B1) qui vont leur permettre de capter les LDLox. Les LDL sont alors hydrolysées, le cholestérol est libéré dans le compartiment lysosomal du macrophage et réestérifié par l'acyl-coenzymeA:cholestérol acyltransférase-1 (ACAT-1), générant des cellules spumeuses, très caractéristiques de la lésion d'athérosclérose précoce. Ce processus est favorisé par l'absence de rétrorégulation des récepteurs scavengers par le contenu intracellulaire de cholestérol, conduisant à une accumulation excessive de cholestérol dans les macrophages.

La réponse inflammatoire va également conduire à la production par les cellules de la paroi vasculaire (cellules endothéliales, CML, macrophages et lymphocytes T) d'un ensemble de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL)-1 $\beta$  ou le tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  qui vont conduire au recrutement de nouveaux monocytes et lymphocytes T contribuant à la progression de la plaque<sup>158,159</sup>.

### ***C. Formation de la chape fibreuse et rupture de la plaque***

Les monocytes et lymphocytes T recrutés au niveau de la plaque vont stimuler la migration des CML de la média vers l'intima ainsi que leur prolifération. Les CML vont alors produire du collagène interstitiel, de l'élastine ainsi que des protéoglycanes et des GAGs qui contribuent à l'épaississement de l'intima et à la formation de la chape fibreuse. Au fur et à mesure que la lésion progresse, les CML et les macrophages peuvent mourir par apoptose causant une

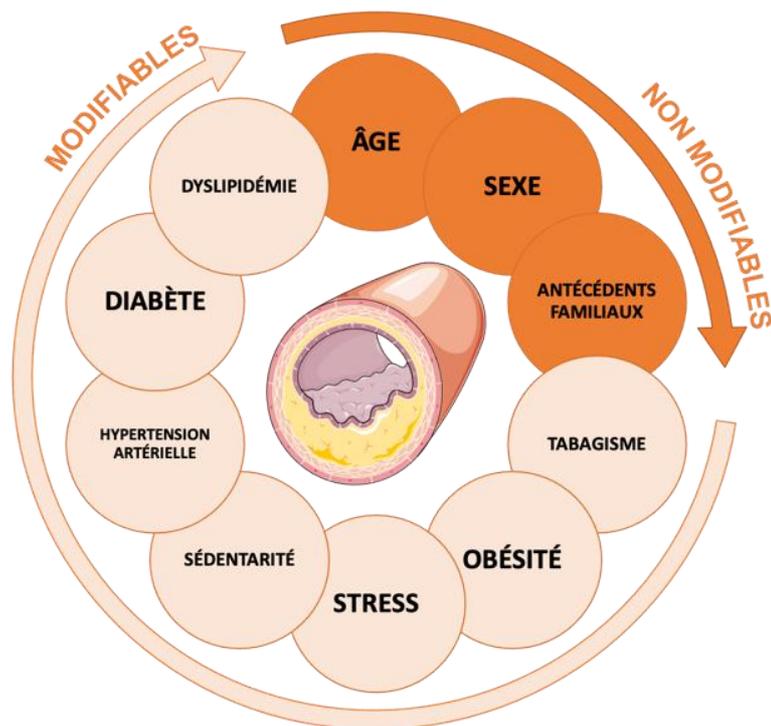
accumulation de débris cellulaires et de lipides au sein de la lésion et formant alors le noyau nécrotique. L'instabilité et la dégradation structurelle de la chape fibreuse, causées par une altération de la synthèse de collagène par les CML ou une production accrue d'enzymes de la famille des MMP par les macrophages qui dégradent le collagène, augmentent la susceptibilité de la plaque à la rupture<sup>158,159</sup>.

L'érosion ou la rupture de la chape fibreuse de la plaque d'athérosclérose permet aux acteurs de la coagulation sanguine d'entrer en contact avec le cœur de la plaque. Ce phénomène peut déclencher une thrombose provoquant l'occlusion progressive du vaisseau et conduisant à un évènement cardiovasculaire tel qu'un infarctus du myocarde ou un AVC<sup>158,159</sup>.

### III. Facteurs de risque de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie multifactorielle et de nombreuses études épidémiologiques ont identifié plusieurs facteurs de risque prédisposant à cette pathologie. L'étude Framingham Heart study (FHS), qui a débuté en 1948, est la première étude épidémiologique sur le long terme encore en cours aujourd'hui (troisième génération). Elle est à l'origine du concept de « facteurs de risque » et une grande partie de ce qui est connu aujourd'hui sur l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires est due à cette étude<sup>161</sup>.

Certains facteurs de risque sont non modifiables tels que les antécédents familiaux de maladies cardiaques précoces, l'âge et le sexe masculin. Il est intéressant de noter que, chez les femmes, le risque cardiovasculaire augmente fortement après la ménopause. Au contraire, d'autres facteurs peuvent être modifiés tels que des facteurs de comportement (tabagisme, régime alimentaire, sédentarité, stress) et des facteurs cliniques (obésité, hypertension artérielle, diabète, dyslipidémie)<sup>158</sup> (**Figure 14**). De plus, depuis peu, il est connu que le risque cardiovasculaire est très élevé chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique. En effet, il a été montré que 50% des individus avec une insuffisance rénale chronique avancée (stage 4 et 5) sont atteints de MCV. Les MCV représentent également environ 40 à 50% de la mortalité chez ces mêmes patients<sup>162</sup>. Ainsi l'insuffisance rénale chronique a été décrit comme un nouveau facteur de risque indépendant de MCV.



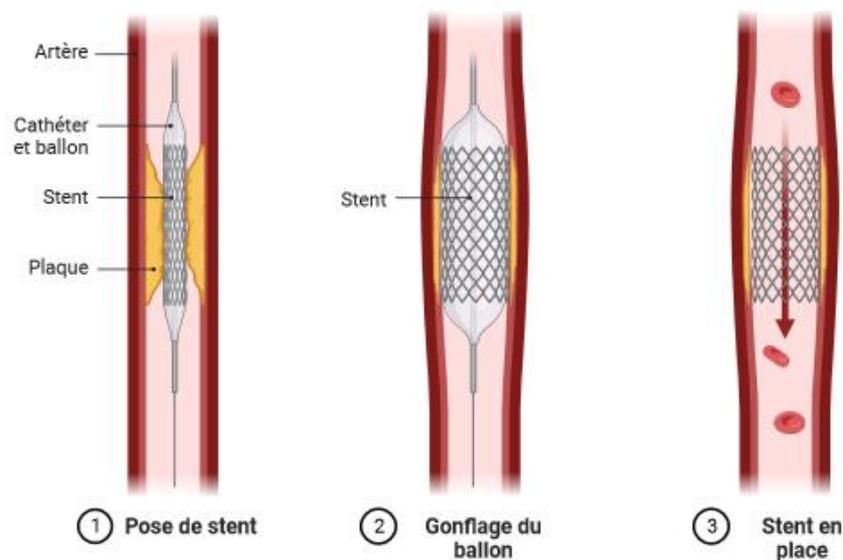
*Figure 14 : Facteurs de risque classiques d'athérosclérose*

#### IV. Prise en charge

Aujourd'hui, plusieurs stratégies sont adoptées pour prendre en charge ces facteurs de risque et limiter la progression de l'athérosclérose et les événements cardiovasculaires. En prévention primaire, il est recommandé d'adopter de meilleures habitudes hygiéno-diététiques, c'est-à-dire modifier le régime alimentaire, pratiquer une activité physique régulière et limiter la consommation de tabac et d'alcool. Ces modifications du mode de vie permettent de cibler et prendre en charge plusieurs facteurs de risque. En effet, il existe une corrélation inverse entre la pratique d'une activité physique et la morbidité/mortalité cardiovasculaire. De plus, un mode de vie sédentaire est associé avec un risque élevé de plusieurs maladies chroniques majeures dont l'athérosclérose. Chez les personnes sans activité physique, la pratique d'une activité physique même très courte (15 minutes par jour) semble avoir des effets bénéfiques. Par ailleurs, les habitudes alimentaires influencent le risque cardiovasculaire via plusieurs facteurs de risque tels que la pression artérielle, le poids corporel, les lipides et le diabète. Il est donc recommandé d'adopter un régime alimentaire sain en optant pour un régime méditerranéen ou similaire pour diminuer le risque de MCV. Il est également conseillé de remplacer les AG saturés par des AG insaturés, de diminuer la

consommation de sel, de consommer une alimentation plus végétale et riche en fibre, de restreindre la consommation d'alcool à maximum 100g par semaine, de préférer les poissons gras à la viande et enfin de diminuer la consommation de sucres. Pour terminer, il est connu que le sevrage tabagique est la stratégie la plus efficace et la plus rentable de toutes les mesures préventives pour diminuer le risque d'athérosclérose et de MCV<sup>163</sup>.

Un traitement médicamenteux est rarement donné en prévention primaire sauf en cas de risque élevé, par contre il est systématiquement prescrit en prévention secondaire après un premier évènement cardiovasculaire afin de réduire le risque d'une nouvelle complication. Ces médicaments ont pour principal objectif d'améliorer le profil lipidique plasmatique. Dans certains cas cliniques, il est également recommandé d'utiliser un traitement antiplaquettaire, antithrombotique, des antihypertenseurs ou des  $\beta$ -bloquants. Par ailleurs, en cas de plaques d'athérosclérose très avancées, une intervention chirurgicale, appelée angioplastie, peut être nécessaire. Au cours d'une angioplastie, un petit ballon gonflable est inséré au niveau de l'occlusion dans l'artère à l'aide d'un cathéter, ce qui va permettre d'élargir l'artère et de comprimer la plaque d'athérosclérose. Le ballon est ensuite dégonflé puis retiré et le plus souvent, cette intervention est complétée par la pose d'une endoprothèse métallique que l'on appelle stent (sorte de mini-ressort), qui permettra de maintenir l'artère ouverte et d'éviter un rétrécissement (**Figure 15**).



**Figure 15** : Représentation schématique d'une angioplastie avec pose de stent

### **A. Traitements hypolipémiants**

Connaissant le rôle clé que jouent les lipides et plus particulièrement les LDL-C dans l'athérogénèse et le risque cardiovasculaire, ils représentent la première cible dans le traitement de l'athérosclérose.

Avant le début des statines, plusieurs molécules telles que la **niacine** ciblant les HDL, la cholestyramine ciblant le cholestérol ou les premiers **fibrates** ciblant les TG, ont été développés afin de réduire le risque cardiovasculaire. Cependant, les études cliniques testant ces molécules ont conduit à des résultats mitigés voire des échecs.

Les **statines** représentent aujourd'hui le traitement de référence des MCV. Ce sont des inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, une enzyme limitante impliquée dans la voie de synthèse du cholestérol, inhibant ainsi la production de cholestérol hépatique et diminuant les concentrations plasmatiques de LDL-C. En cas d'intolérance ou de résistance aux statines, il est possible de les associer ou d'utiliser d'autres molécules tels que **l'ézetimibe** qui bloque l'absorption intestinale du cholestérol en inhibant NPC1L1 qui joue un rôle important dans l'absorption de cholestérol par les entérocytes. Il est également possible d'utiliser des inhibiteurs de la proprotéine convertase subtilisine/kexin type 9 (PCSK9) impliquée dans la dégradation du LDLr et donc dans l'homéostasie des LDL-C. Parmi ces inhibiteurs PCSK9, on retrouve les anticorps anti-PCSK9 que sont **l'évolocumab** et **l'alirocumab**, déjà sur le marché, et **l'inclisiran**, un small interfering RNA (siRNA) dirigé contre PCSK9 qui est actuellement en cours d'évaluation sur le risque cardiovasculaire dans l'étude de phase III, ORION-4 (rapport attendu en 2024). De plus, **l'acide bempédoïque** a également récemment montré qu'il réduisait le risque d'événements cardiovasculaires (étude CLEAR). En effet, l'acide bempédoïque est une prodrug activée par la very long-chain acyl-CoA synthétase-1 (ACSVL1) conduisant à la formation de sa forme active, le bempédoyl-CoA. Ce bempédoyl-CoA agit comme un inhibiteur de l'ATP citrate lyase intervenant dans la voie de synthèse du cholestérol (en amont de l'HMG-CoA réductase, cible des statins), et diminue les concentrations plasmatiques de LDL-C. La forme active de l'acide bempédoïque est produite seulement dans le foie là où est majoritairement présente l'ACSVL1. Il ne présente donc pas d'effets secondaires comme des myopathies comme il peut être observé avec les statines.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les TG et les lipoprotéines riches en TG (triglycéride-rich lipoprotein, TRL) semblent jouer un rôle sur le risque résiduel de MCV. C'est pourquoi plusieurs molécules ont été développées afin de traiter ce risque résiduel associé à

des taux élevés de TG et de TRL. Parmi eux, les **fibrates** sont des agonistes du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ , et sont utilisés chez l'Homme pour diminuer les concentrations plasmatiques de TG et augmenter celles en HDL-C. Les fibrates ont été testés dans plusieurs études cliniques, seuls ou en association avec des statines, mais leur effet sur le risque cardiovasculaire est assez controversé. Les acides gras omega 3 polyinsaturés, comme l'**acide eicosapentaénoïque (EPA)**, sont également des candidats thérapeutiques intéressants puisqu'ils sont capables de diminuer les concentrations plasmatiques de TG. Dans l'essai clinique de phase III STRENGTH, la supplémentation quotidienne d'**EPA et d'acide docosahexaénoïque (DHA)** n'a pas entraîné de différence significative sur le risque d'évènements cardiovasculaires. Par contre, le traitement par l'EPA seul a réduit le risque d'évènements coronariens majeurs chez des patients japonais. De plus, l'**icosapent éthyl (IPE)**, une forme stable et purifiée de l'EPA, a diminué le risque de survenue des évènements cardiovasculaires dans l'étude REDUCE-IT, même s'il semblerait que ses effets ne soient pas directement associés à la diminution des TG, suggérant l'implication d'autres mécanismes.

Ainsi, les recommandations actuelles sur la prise en charge du risque cardiovasculaire mettent en avant l'importance de diminuer les concentrations de LDL-C le plus bas possible selon le principe « lower is better ». Il est possible d'atteindre ces objectifs drastiques grâce au développement des thérapies combinées utilisant l'ézetimibe ou les inhibiteurs PCSK9 en combinaison avec une statine.

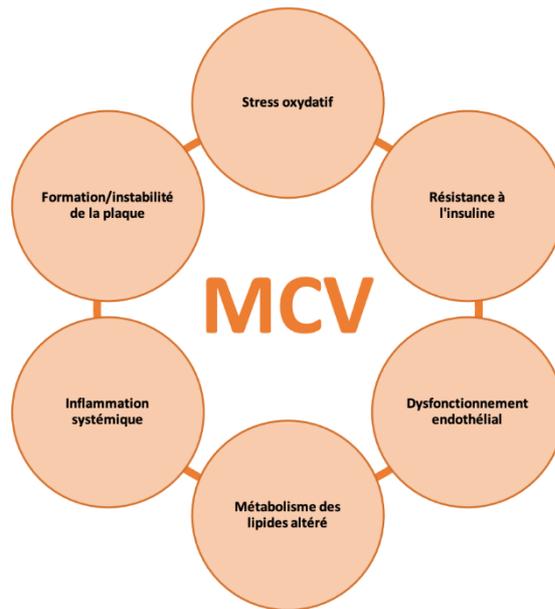
### **B. Nouvelles stratégies non hypolipémiantes**

En plus des lipides, de nombreux mécanismes interviennent dans la pathogénèse de l'athérosclérose, et notamment l'inflammation. En effet, Ridker *et al.* ont montré que l'inflammation évaluée par la mesure de hsCRP était un meilleur prédicteur de risque d'évènements cardiovasculaires que le cholestérol (LDL-C)<sup>164</sup>. C'est pourquoi il semble intéressant de cibler l'inflammation pour la prise en charge du risque de MCV. De cette manière, la **colchicine**, une molécule anti-inflammatoire puissante, a été testée dans plusieurs études cliniques où elle a montré un effet bénéfique sur le risque d'évènements cardiovasculaires<sup>165-167</sup>. Elle est aujourd'hui approuvée au Canada pour diminuer le risque de MCV. De plus, le **canakinumab**, un anticorps anti-IL-1 $\beta$ , a été testé sur le risque cardiovasculaire dans l'étude CANTOS et il a montré une réduction du nombre d'évènements cardiovasculaires

par rapport au placebo, indépendamment d'un effet sur les lipides<sup>168</sup>. Il a cependant été associé à un risque plus élevé de maladies infectieuses ce qui a stoppé la poursuite de son développement. Récemment, le **ziltivekimab**, un anticorps anti-Il-6, a réduit significativement le niveau de biomarqueurs d'inflammation et de thrombose liés à l'athérosclérose chez des patients présentant un risque élevé d'athérosclérose (étude RESCUE)<sup>169</sup>, ce qui semble prometteur et ouvre la voie à une étude clinique de Phase III.

#### V. La MASLD : un nouveau facteur de risque pour l'athérosclérose ?

De multiples preuves laissent suggérer que la MASLD est associée aux MCV et pourrait même être un facteur de risque indépendant des facteurs de risque classiques. En effet, plusieurs études suggèrent que les patients atteints de MASLD présentent un risque plus élevé d'événements cardiovasculaires mortels et/ou non mortels<sup>19</sup>. Zhou *et al.* ont rapporté que la MASLD, et plus particulièrement la MASH, était associée à une plus grande épaisseur de l'intima-média de l'artère carotide, à une plus grande rigidité artérielle, à une calcification accrue de l'artère coronaire et à un dysfonctionnement endothélial<sup>170</sup>. Ce risque est d'autant plus élevé que la MASLD est sévère. De plus, la MASLD affecterait également toutes les autres structures anatomiques du cœur (dysfonctionnement diastolique, hypertrophie du ventricule gauche, arythmie)<sup>19</sup>. Toutefois, la contribution spécifique de la MASLD à l'augmentation du risque de MCV est incertaine, car ces deux pathologies ont en commun plusieurs facteurs de risque cardiométaboliques, notamment l'obésité abdominale, la dyslipidémie athérogène, l'hypertension et l'hyperglycémie. De multiples mécanismes physiopathologiques par lesquels la MASLD pourrait augmenter le risque de MCV sont proposés, comme l'inflammation systémique, la résistance à l'insuline, le stress oxydatif ou l'altération du métabolisme lipidique (**Figure 16**). Néanmoins, le lien de causalité entre la MASH et les MCV, ainsi que les mécanismes impliqués restent encore peu claires et doivent être démontrés, nécessitant l'utilisation et la mise au point de modèles précliniques adaptés de MASLD et d'athérosclérose<sup>19,171</sup>.



***Figure 16 : Mécanismes pathophysiologiques liant potentiellement la MASLD et le risque de MCV, d'après Stahl et al., 2019<sup>171</sup>***



## **PARTIE 5 : LES MODÈLES PRÉCLINIQUES MURINS**

### **DE MASLD ET D'ATHEROSCLEROSE**

Aujourd'hui, il est bien connu que la plupart des pathologies liées au métabolisme comme la MASLD ou l'athérosclérose, sont le résultat de plusieurs dysfonctionnements faisant intervenir plusieurs tissus au sein de l'organisme. Utilisées seules, les méthodes *in vitro* et *in silico* ne sont pas suffisantes pour comprendre l'origine de ces pathologies. En effet, ces techniques ne permettent pas reproduire les interactions multiples et les dialogues inter-organes que l'on retrouve lors de la pathogénèse de la MASLD ou de l'athérosclérose. Les modèles précliniques animaux restent alors indispensables pour étudier ces pathologies. Les souris sont devenues l'espèce prédominante utilisée en expérimentation animale en raison de leur petite taille, de leur reproduction rapide, de leur facilité de manipulation génétique, et de leur forte homologie génétique avec l'Homme. Dans cette section seront discutés les modèles précliniques murins existants qui sont utilisés actuellement pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de la MASLD et de l'athérosclérose.

#### **I. Modèles précliniques murins de MASLD**

La prévalence de la MASLD augmentant rapidement dans le monde entier à cause de l'évolution des modes de vie et des habitudes alimentaires, il devient indispensable de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogénèse de cette maladie chronique et de mettre au point de nouveaux traitements. Pour les raisons mentionnées précédemment, les modèles animaux sont des outils indispensables pour atteindre ces objectifs. À ce jour, aucun modèle murin ne présente l'ensemble du spectre de la MASLD humaine avec les caractéristiques métaboliques associées. Cependant, plusieurs modèles ont déjà vu le jour grâce à la combinaison de régimes spéciaux, de modifications génétiques et/ou de l'injection de substances chimiques, pouvant mimer certaines caractéristiques de la MASLD. Dans ce paragraphe, je vous présenterai les principaux modèles de MASLD/MASH, leurs avantages et leurs inconvénients.

### **A. Modèles induits par un régime**

De nombreux modèles basés sur la suralimentation tentent de mimer les caractéristiques histologiques hépatiques ainsi que les perturbations métaboliques similaires à la MASLD humaine. Cependant, certains régimes alimentaires caractérisés parfois par des déficiences, sont très différents de ce qu'il est connu chez l'Homme.

#### **1. Le régime high fat diet (HFD) et ses variations**

Les **régimes HFD** riches en graisse, mimant les régimes alimentaires humains occidentaux, sont les régimes alimentaires les plus utilisés aujourd'hui pour induire des modèles murins de MASH. Les régimes HFD peuvent varier en termes de composition nutritionnelle, de source et de quantité de graisse (animale ou végétale). Généralement les régimes HFD conventionnels contiennent entre 45% et 75% de graisse de l'apport calorique total (kcal). Il est important de noter que les régimes HFD peuvent avoir des effets variables en fonction du temps d'exposition à ces régimes (régime de 10 semaines pouvant aller jusqu'à 80 semaines), du sexe et de la souche murine utilisée, mais ils permettent généralement tous d'induire un syndrome métabolique (obésité, hyperlipidémie, IR) accompagné de stéatose hépatique, avec plus ou moins de MASH et de fibrose. En outre, les régimes HFD peuvent également entraîner des changements dans la composition bactérienne intestinale et conduire à une dysbiose intestinale comme il est observable chez les patients atteints de MASLD<sup>172-175</sup>.

Pour accentuer l'effet des régimes HFD, il est possible de les compléter avec du cholestérol, puisque ce dernier est associé avec la progression de la MASH et rend le foie plus sensible. Ce sont les **régimes high fat high cholesterol (HFHC)** qui permettent d'exacerber l'obésité, la stéatose et l'inflammation hépatique ainsi que la fibrose<sup>172-175</sup>.

Par ailleurs, il est également possible d'ajouter du **fructose** au régime HFD qui va permettre d'induire de manière plus importante du stress oxydatif, de l'inflammation, du dépôt de collagène et donc de la fibrogénèse au niveau du foie, en plus de la prise de poids, de l'IR, de la stéatose hépatique et de l'inflammation observés avec les régimes HFD classiques. De plus, de manière intéressante, le fructose peut également conduire à une dysbiose intestinale en favorisant la prolifération bactérienne intestinale, ce qui va entraîner une augmentation de perméabilité intestinale et des niveaux importants d'endotoxines dérivées de l'intestin dans la circulation. Cela va alors activer les cellules de Kupffer au niveau du foie et augmenter l'inflammation hépatique<sup>172-175</sup>.

Enfin, il est également possible de combiner à la fois, HFD, cholestérol et fructose. Parmi ces régimes, le régime **high fat, high fructose and high cholesterol (HFFC)**, auparavant appelé **régime Amylin Liver NASH (AMLN)** est fréquemment utilisé pour établir des modèles animaux de syndrome métabolique. Ce régime est classiquement composé de 40% de graisse, 22% de fructose et 2% de cholestérol et permet de développer tous les stades de MASLD parfois même jusqu'à la cirrhose<sup>174,175</sup>. Il existe également le **régime fast-food**, basé sur une teneur différente en graisses, fructose et cholestérol (41 % de graisses, 30 % de fructose, 2 % de cholestérol), capable de mimer la MASH avec fibrose, accompagnée d'obésité et d'IR, dans différents modèles animaux<sup>175</sup>.

## **2. Le régime déficient en méthionine et en choline (MCD)**

Le **régime MCD**, modèle typique d'induction de la MASH par un régime, est composé d'une teneur élevée en sucrose et d'une teneur modérée en matières grasses (40 % de sucrose, 10 % de matières grasses) et il ne contient pas de méthionine et de choline, nutriments essentiels à la  $\beta$ -oxydation hépatique et à la production de VLDL. Les souris nourries avec un régime MCD développent une stéatose hépatique en raison de concentrations hépatiques d'AG élevées et de faibles niveaux de sécrétion de VLDL. Elles présentent également une inflammation hépatique marquée ainsi qu'une fibrose précoce (développement en 8-10 semaines). En outre, les souris sous MCD présentent du stress oxydatif et une augmentation de la voie NF- $\kappa$ B et des cytokines/adipokines pro-inflammatoires associées. Bien que le régime MCD entraîne une apparition rapide du phénotype MASH avec de l'inflammation, du ballooning et de la fibrose, les animaux ne présentent pas d'autres caractéristiques métaboliques observées dans la MASLD humaine, notamment l'obésité, l'IR ou la dyslipidémie. Au contraire, les souris nourries avec un régime MCD présentent une perte de poids significative, une diminution des TG et du cholestérol plasmatique, une diminution des concentrations de glucose et d'insuline, une augmentation des concentrations de leptine, et un niveau plasmatique d'adiponectine inchangé ou augmenté. Par conséquent, ce modèle peut être utilisé pour étudier les événements intrahépatiques associés à la MASH et tester des traitements anti-MASH, mais il est considéré comme inadéquat pour étudier les événements pathologiques multi-systémiques associés à la MASLD<sup>172-175</sup>.

### **3. Le régime choline-déficient L-amino acid-defined (CDAA) et ses variations**

Le régime CDAA est similaire au régime MCD en raison de leur déficit commun en choline, mais sa teneur en protéines est modifiée par un mélange équimolaire d'acides aminés L. Comme pour le régime MCD, le régime CDAA induit une diminution de l'oxydation des AG dans les hépatocytes et une augmentation de la synthèse des lipides et de leur dépôt dans le foie. Il provoque de la stéatose hépatique, induit du stress oxydatif, de l'inflammation et de la fibrose. La progression de ces changements histologiques est plus longue avec le régime CDAA comparé au régime MCD, mais le degré de MASH est légèrement plus sévère. De plus, avec un temps très long (plus d'un an), le régime CDAA peut également permettre d'induire le développement de carcinomes hépatocellulaires (HCC). Bien que le régime CDAA n'induit pas la perte de poids observée avec le régime MCD, les caractéristiques métaboliques de la MASLD humaine n'apparaissent toujours pas. Néanmoins, une étude a montré qu'après un régime CDAA, les souris présentent une augmentation significative de l'homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) et des concentrations d'insuline, suggérant une résistance à l'insuline.

Le régime CDAA peut être combiné à un régime HFD appelé **choline-déficient, L-amino acid-defined, high-fat diet (CDAHFD)**. De manière intéressante, le régime CDAHFD peut rapidement (en une semaine) induire une stéatose accompagnée d'un dysfonctionnement mitochondrial et d'un stress oxydatif sévère, mais sans fibrose. Sa caractéristique unique est qu'en modulant la teneur en méthionine de ce régime, il est possible de déterminer si les souris développent de l'obésité ou non. Cependant, il n'est toujours pas suffisant pour déclencher un syndrome métabolique<sup>172-175</sup>.

### **4. Le régime déficient en choline et supplémenté en éthionine (CDE)**

L'éthionine est un acide aminé analogue éthylique de la méthionine (un groupe éthylique à la place d'un groupe méthylique). Le régime CDE, dérivé du régime MCD, induit une stéatose et une inflammation peu après le début de son administration, suivies d'une fibrose, d'une cirrhose et d'un HCC à plus long terme. Cependant, contrairement au phénotype de la MASLD chez l'homme, ce régime CDE entraîne une perte de poids, tout en provoquant une mortalité élevée. Pour limiter cette mortalité tout en maintenant la stéatose hépatique, l'inflammation

et la carcinogénèse, certaines études alternent l'administration de CDE avec un régime standard ou contrôle<sup>175</sup>.

### **B. Modèles génétiques**

Beaucoup de modèles génétiques ont été développés afin de mieux comprendre la MASH. Ces modèles sont différents de la pathologie humaine qui ne présente pas d'altération de la plupart de ces gènes spécifiques. Pour la plupart de ces modèles, les altérations génétiques conduisent à une accumulation de lipides hépatiques sans inflammation ni fibrose évidente. Il est fréquent de combiner ces modèles génétiques à un régime alimentaire spécifique pour induire les caractéristiques histopathologiques et biochimiques de la MASH.

#### **1. Le modèle murin *ob/ob* : un modèle déficient pour la leptine**

Les souris *ob/ob* possèdent une mutation spontanée dans le gène de la leptine qui est une adipokine régulant le comportement alimentaire (effet anorexigène par la stimulation de la satiété au niveau de l'hypothalamus) et augmentant la dépense énergétique. En conséquence, les souris *ob/ob* sont inactives, hyperphagiques et obèses, elles présentent une hyperlipidémie, une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, de l'IR et elles développent une dysbiose intestinale ainsi qu'une stéatose hépatique spontanée similaire à la MASLD humaine. Les souris *ob/ob* développent de la stéatose hépatique mais évoluent rarement vers une MASH spontanée avec de l'inflammation et de la fibrose. Par conséquent, un stimulus supplémentaire est nécessaire. Par exemple, il est possible d'utiliser un régime HFD ou un régime MCD pour induire les caractéristiques de la MASH<sup>172-175</sup>.

Chez l'Homme, des mutations de la leptine ont été identifiées, néanmoins les concentrations plasmatiques de leptine sont normales ou élevées chez les patients MASH par rapport aux patients sains, ce qui représente un défaut de ce modèle. Cependant, il peut être intéressant pour étudier la stéatose et les altérations métaboliques systémiques qui y sont associées.

#### **2. Le modèle murin *db/db* : un modèle déficient pour le récepteur à la leptine**

Les souris *db/db* possède une mutation spontanée dans le gène *db* codant pour le récepteur à la leptine, ce qui se traduit par une signalisation altérée de la leptine et une résistance à ses effets. De la même manière que les souris *ob/ob*, les souris *db/db* sont

inactives, hyperphagiques, obèses, présentent une hyperlipidémie, une hyperglycémie, une hyperinsulinémie et de l'IR. Elles développent une stéatose hépatique mais pas d'inflammation, de ballooning ni de fibrose. Elles ont également besoin d'un deuxième stimulus tel qu'un régime alimentaire spécifique pour développer de la MASH et de la fibrose. Une mutation analogue existe chez les rats : *fa/fa*, également connus sous le nom de rats Zucker. Les rats *fa/fa* présentent des caractéristiques similaires à celles des souris *ob/ob* et *db/db*.<sup>172-175</sup>

### **3. Le modèle murin *foz/foz* : une mutation dans le gène *Alms1***

Dans le syndrome d'Alström, les patients possèdent une mutation sur le gène *Alms1* impliqué dans le contrôle de la satiété. Cette maladie multi-systémique se caractérise, entre autres, par une dysfonction métabolique et endocrine avec de l'obésité, un syndrome métabolique et du diabète. Les souris Fat Aussie (*foz/foz*) présentent une délétion spontanée dans le gène *Alms1*<sup>176,177</sup> les rendant hyperphagiques et obèses, avec des concentrations plasmatiques de cholestérol, d'insuline et de glucose anormalement élevées, et des concentrations plasmatiques d'adiponectine diminuées. Au niveau du foie, les souris *foz/foz* présentent une altération du métabolisme des lipides augmentant le stockage des lipides dans le foie et induisant ainsi une stéatose prononcée. Comme d'autres modèles génétiques murins de MASLD, le modèle *foz/foz* doit être soumis à une alimentation riche en graisses pour induire une MASLD avancée. Par ailleurs, il est important de faire attention au choix du fond génétique des souris *foz/foz* car les caractéristiques et la sévérité de la MASH induites par un régime sont dépendantes de la souche : par exemple, il est plus intéressant de choisir un fond C57BL/6 plutôt que des souris BALB/c<sup>172-175</sup>.

### **4. Les souris *KKAy/a***

Les souris *KKAy/a* sont obtenues en croisant des souris diabétiques *KK* avec des souris obèses (*Ay*) (présentant une fourrure jaune à cause d'une perte de mélanocortine). Ces souris sont porteuses d'une mutation du gène de la protéine agouti qui antagonise le récepteur de la mélanocortine impliqué dans la régulation de la prise alimentaire. Les souris *KKAy/a* sont obèses, hyperphagiques, hyperglycémiques, hyperinsulinémiques (avec de l'IR), hypercholestérolémiques et hypertriglycéridémiques, et présentent une stéatose hépatique.

Un stimulus supplémentaire peut être nécessaire pour induire une MASLD plus avancée, mais le phénotype des souris KKAy/a est malgré tout assez comparable au syndrome métabolique chez l'Homme<sup>172</sup>.

#### **5. Les souris déficientes pour le récepteur de la mélanocortine MC4R (*Mc4r*<sup>-/-</sup>)**

Chez l'Homme, les mutations du gène *Mc4r* constituent la cause monogénique connue la plus fréquente de l'obésité. En effet, MC4R est un récepteur couplé à la protéine G (RCPG) exprimé dans les noyaux hypothalamiques qui régule la prise alimentaire et le poids corporel. La délétion de ce récepteur chez les souris entraîne le développement d'une obésité, une hyperphagie, une hyperinsulinémie et une hyperglycémie. Sous régime HFD, les souris *Mc4r*<sup>-/-</sup> développent de la stéatose, du ballooning, de l'inflammation et de la fibrose (associés à de l'obésité, IR et dyslipidémie) et sur un temps plus long, peuvent même développer un HCC<sup>173,175</sup>.

#### **6. Les souris "diet induced animal model of nonalcoholic fatty liver disease" (DIAMOND)**

Les souris DIAMOND ont été créées par croisement entre la souche commune C57BL/6J et la souche 129S1/SvImJ connues pour être susceptibles de développer certaines maladies telles que le diabète. Soumises à un régime western, les souris DIAMOND développent rapidement de l'obésité, de l'IR, une hypertriglycéridémie et une hypercholestérolémie plutôt associée aux LDL-C. Elles développent progressivement de la stéatose, de la MASH, de la fibrose sévère avec du « bridging » et un HCC. Il est intéressant de noter que les souris DIAMOND présentent un schéma d'activation des voies au niveau transcriptomique similaire à celui des patients atteints de MASH<sup>178</sup>.

#### **7. Les souris déficientes pour le phosphatase and tensin homolog PTEN (*Pten*<sup>-/-</sup>)**

En tant que gène suppresseur de tumeur, PTEN régule négativement plusieurs cascades de signalisation intervenant dans la régulation de l'apoptose, la prolifération cellulaire et la formation des tumeurs. PTEN est muté dans de nombreux cancers humains et joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie et la prévention de l'oncogenèse dans le foie, et il a été identifié comme un régulateur du métabolisme du glucose et de la signalisation de

l'insuline. Les souris *Pten*<sup>-/-</sup> développent de la stéatose, du ballooning des hépatocytes, de l'inflammation, des corps de Mallory, suivis de fibrose et d'HCC, mimant ainsi la progression de la MASH humaine. Elles développent également une hypersensibilité à l'insuline<sup>172,175</sup>.

#### **8. Les souris déficientes pour la méthionine adénosyltransferase 1A (MAT1A) : *Mat1a*<sup>-/-</sup>**

Les méthionine adénosyltransférases sont des produits de deux gènes, *Mat1a* et *Mat2a*, et catalysent la formation de S-adénosylméthionine, le principal donneur de groupement méthyl. *Mat1a* est exprimé spécifiquement dans le foie, tandis que *Mat2a* est exprimé dans les tissus extra-hépatiques. Les souris *Mat1a*<sup>-/-</sup> ont un poids du foie plus élevé que les animaux sauvages. Elles développent une stéatose spontanée et de l'inflammation, et sur un temps plus long, un HCC. Il a été montré que la déficience du gène *Mat1a* inhibe la synthèse des VLDL et altère l'homéostasie des lipides plasmatiques, contribuant ainsi au développement de la MASLD chez ces souris<sup>172,173,175</sup>.

#### **9. Les souris déficientes pour l'acyl-CoA oxidase ACOX (*ACOX*<sup>-/-</sup>)**

L'ACOX est une enzyme limitante de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale des AG à très longue chaîne. Les souris *Acox*<sup>-/-</sup> présentent donc une  $\beta$ -oxydation peroxysomale dysfonctionnelle conduisant à l'accumulation des AG dans le foie et à une stéatohépatite sans fibrose marquée. A un âge plus avancé, les hépatocytes stéatosiques sont remplacés par des hépatocytes non stéatosiques. Ces hépatocytes régénérés présentent une prolifération spontanée des peroxysomes due à l'activation de PPAR $\alpha$ , ce qui peut conduire au développement d'HCC<sup>172,174</sup>.

#### **10. Les souris déficientes pour PPAR $\alpha$ (*Ppara*<sup>-/-</sup>)**

PPAR $\alpha$  est un récepteur nucléaire clé qui régule la transcription des gènes impliqués dans l'homéostasie lipidique et notamment dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomale des AG (**cf. Partie 5**). À jeun ou sous un régime alimentaire riche en graisse, les souris *Ppara*<sup>-/-</sup> développent de la stéatose hépatique sévère sans évoluer vers la MASH. Cependant, lorsqu'elles sont stimulées par un régime (par exemple un régime MCD), elles développent une stéatohépatite plus sévère que les souris sauvages<sup>179,180</sup>. Ces effets sont également observés dans des souris déficientes pour PPAR $\alpha$  seulement dans les hépatocytes<sup>181,180,182</sup>.

### **11. Les souris déficientes pour l'apolipoprotéine E (*ApoE*<sup>-/-</sup>) et les souris ApoE2 knock-in (*ApoE2KI*)**

L'ApoE joue un rôle important dans le métabolisme des lipoprotéines. Les souris *ApoE*<sup>-/-</sup> présentent spontanément des taux de cholestérol élevés et une inflammation accrue par rapport aux souris sauvages, et sont généralement utilisées dans la recherche cardiovasculaire comme modèle de dyslipidémie<sup>183</sup>. Sous régime standard, les souris *ApoE*<sup>-/-</sup> développent seulement une stéatose. Par contre, lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en graisse, les souris *ApoE*<sup>-/-</sup> montrent une augmentation de leur poids corporel, une augmentation des concentrations plasmatiques de glucose et de cholestérol, une hépatomégalie et elles développent le spectre complet de la MASLD, allant de la stéatose hépatique à l'inflammation, au ballooning et à la fibrose<sup>175</sup>.

Par ailleurs, le gène *ApoE* murin peut également être remplacé par le gène *ApoE2* humain générant le modèle de souris ApoE2 knock-in (*ApoE2KI*) utilisé comme modèle d'athérosclérose. Soumises à un régime riche en graisse, les souris *ApoE2KI* développent très rapidement une inflammation accrue indiquant une MASH par rapport aux souris sauvages<sup>175</sup>.

### **12. Les souris déficientes pour le LDLr (*Ldlr*<sup>-/-</sup>)**

Les souris hyperlipidémiques *Ldlr*<sup>-/-</sup> sont, avec les souris *ApoE*<sup>-/-</sup>, un des modèles dyslipidémiques les mieux caractérisés et ont d'abord également été utilisées comme modèle d'athérosclérose<sup>183</sup>. Sous régime riche en graisse et en cholestérol, les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> femelles développent de la stéatose avec une inflammation sévère, et les mâles de l'inflammation hépatique sévère sans stéatose. Sur un temps plus long, elles peuvent également développer de la fibrose. De plus, ces souris présentent des taux élevés de LDL et des taux faibles de HDL, reproduisant le profil lipidique humain<sup>175</sup>.

Les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>.*Leiden* (TNO, Metabolic Health Research, Leiden, Pays-Bas), une souche particulière de souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>, ont été créées avec 94 % de fond C57BL/6 et 6 % de fond 129S1/SvImJ. Lorsque les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>.*Leiden* sont nourries avec un régime HFD ou un régime Fast-food, elles développent de l'obésité, une hyperlipidémie et une hyperinsulinémie associées au développement de stéatose hépatique, d'inflammation et de fibrose ainsi qu'au développement d'athérosclérose. Le régime HFD induit une hyperinsulinémie plus sévère,

tandis que le régime Fast-food induit une inflammation hépatique plus sévère et une fibrose plus avancée avec « brindging » ainsi qu'une athérosclérose plus grave<sup>175</sup>.

### **13. Les souris PNPLA3 knock-in (KI)**

Comme mentionné plus haut, les mutations de certains gènes tels que PNPLA2, TM6SF2 ou MBOAT7 sont associées à un plus grand risque de MASLD. Certaines modifications génétiques chez la souris ont été réalisées afin de reproduire ces mutations et induire un phénotype de MASLD. Parmi elles, les souris PNPLA3KI, reproduisant la mutation du gène PNPLA3 chez l'Homme, développent de la stéatose hépatique après 3-4 semaines de régime riche en sucre comparées aux souris exprimant le gène PNPLA3 sauvage. Par contre, ces souris PNPLA3KI ne présentent pas d'autres caractéristiques histologiques et métaboliques associées à la progression de la MASLD telles que l'inflammation ou la fibrose<sup>174,175,184</sup>.

### **14. Les souris mutées pour TM6SF2 dans le foie**

De la même manière, les souris avec un knockdown spécifique de *Tm6sf2* dans le foie présentent des concentrations hépatiques de TG élevées et une réduction de la sécrétion de VLDL, exacerbées avec un régime riche en sucre. Ces effets sont également observés dans des souris déficientes pour *Tm6sf2* spécifiquement dans le foie. Nourries avec un régime riche en graisse, ces souris sont également capables de développer de la stéatose hépatique, mais également de la fibrose pouvant évoluer jusqu'au HCC<sup>174,175,184</sup>.

### **15. Les souris déficientes pour MBOAT7 dans le foie**

La déficience en MBOAT7 spécifiquement dans le foie de souris induit le développement spontané de stéatose au niveau du foie ainsi qu'une augmentation de la DNL via l'activation de SREBP-1c. Cette stéatose est exacerbée grâce à un régime riche en graisse pouvant également induire de la fibrose<sup>184</sup>.

## ***C. Modèles induits par une substance chimique***

La pathogenèse de la MASLD est complexe et les facteurs environnementaux tels que les substances chimiques/pharmacologiques jouent un rôle important. Cependant, l'utilisation d'un produit chimique seul n'induit pas un modèle idéal de MASLD, c'est pourquoi il est souvent associé à des régimes spécifiques.

### **1. Administration de tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>)**

Le CCl<sub>4</sub> est la substance hépatotoxique la plus utilisée pour induire et explorer le développement et la progression de la fibrose et de la cirrhose hépatique. En produisant des radicaux libres et donc du stress oxydatif et de l'inflammation, le CCl<sub>4</sub> accélère le processus de dégénérescence et de destruction de la structure et de la fonction des hépatocytes conduisant au développement de fibrose. Cependant, la pathogenèse, l'évolution de la maladie et les changements morphologiques sont différents de ceux observés dans la MASH humaine. D'autre part, le CCl<sub>4</sub> induit une fibrose, mais pas d'obésité ni d'IR. Ainsi, la combinaison d'un régime, tel que le HFD ou le CDAA avec le CCl<sub>4</sub>, peut être utilisée pour établir des modèles de MASLD. Par ailleurs, il est important de noter que le CCl<sub>4</sub> reste une substance chimique et peut induire une certaine toxicité si la dose n'est pas contrôlée<sup>174,175</sup>.

### **2. Administration de streptozotocine : modèle de souris STAM**

Pour modéliser la MASH, il est également possible d'administrer à des animaux nouveaux une faible dose de streptozotocine. Elle va induire une inflammation conduisant à la destruction des cellules β des îlots pancréatiques provoquant ainsi un diabète de type 1. En revanche, cette méthode couplée à un régime riche en graisse permet d'établir un modèle de MASLD appelé STAM qui développe plusieurs caractéristiques histologiques importantes de la MASLD de la simple stéatose en passant par l'inflammation, le ballooning, la fibrose jusqu'au HCC. Cependant, la destruction des cellules β des îlots pancréatiques par la streptozotocine mime plutôt une carence en insuline comme observé dans le diabète de type 1 et n'induit pas d'IR et d'hyperinsulinémie comme généralement observé dans la MASLD humaine<sup>173-175</sup>.

### **3. Administration de tétracycline**

La tétracycline inhibe la réplication et/ou la transcription de l'ADN mitochondrial ce qui bloque la sécrétion de VLDL et induit une dégénérescence hépatocellulaire. 24h après l'administration de tétracycline, l'évaluation histopathologique a montré une stéatose accompagnée d'une augmentation de la biosynthèse du cholestérol et des TG, et d'une diminution de la β-oxydation des AG. Le modèle de la tétracycline présente des avantages tels qu'un temps court, un faible coût et une toxicité inférieure à celle du CCl<sub>4</sub><sup>172</sup>.

Bien que la nécessité d'avoir de meilleurs modèles animaux pour l'ensemble du spectre de la MASLD devient de plus en plus cruciale pour la recherche translationnelle, le développement de ces modèles reste difficile en raison de la complexité de cette pathologie. Plusieurs stratégies ont été adoptées, combinant des modèles induits par des régimes (HFD, MCD...) et/ou des modèles génétiques (*ob/ob*, *db/db*, *foz/foz*, *Ppara*<sup>-/-</sup>...) et/ou des modèles chimiques (STAM, CCl<sub>4</sub>). Ces modèles ont tout de même des limites car ils présentent notamment des différences par rapport à la MASH humaine et ils nécessitent parfois une longue période de temps pour induire les caractéristiques de la MASH. Aujourd'hui, il n'existe pas de modèle idéal pour mimer la MASLD. Cependant, si on tient compte des hypothèses/objectifs de recherche spécifiques de chaque étude, certains modèles peuvent être utilisés avec succès pour étudier les mécanismes pathophysiologiques et/ou les traitements liés à la MASLD.

## **II. Modèles précliniques murins d'athérosclérose**

Au cours des dernières décennies, la souris est devenue l'espèce prédominante pour étudier l'athérosclérose puisqu'elles sont capables de développer de l'athérosclérose sur un temps raisonnable. Cependant, les souris présentent un profil lipidique plasmatique différent de l'Homme. En effet, leur cholestérol est majoritairement transporté dans les HDL, tandis que les LDL athérogènes et leurs précurseurs VLDL et IDL sont rapidement éliminés de la circulation. Chez l'Homme, le profil lipidique athérogène classiquement retrouvé se caractérise par des taux élevés de LDL-C et une diminution de HDL-C, avec ou sans augmentation de VLDL-C et IDL-C. C'est pourquoi la plupart des manipulations génétiques actuelles sur les souris pour étudier l'athérosclérose sont basées sur des modifications de leur métabolisme lipidique, afin de générer une hypercholestérolémie non basée sur les HDL. Ceci est par exemple possible en inactivant l'ApoE (*ApoE*<sup>-/-</sup>) ou le LDLr (*Ldlr*<sup>-/-</sup>). Les souris *apoE*<sup>-/-</sup> et *LDLr*<sup>-/-</sup> sont aujourd'hui les modèles murins génétiques d'athérosclérose les plus couramment utilisés (**Tableau 6**).

### **A. Les souris déficientes pour l'apoE (*ApoE*<sup>-/-</sup>)**

L'ApoE, majoritairement synthétisée par le foie, est une composante structurelle de toutes les lipoprotéines exceptées les LDL. Elle sert de ligand pour les récepteurs des lipoprotéines

tels que le LDLr ou le LRP, ce qui lui permet d'assurer le transport du cholestérol entre les cellules du corps humain, mais surtout elle permet d'assurer la clairance hépatique des chylomicrons et des remnants de VLDL<sup>185-187</sup>.

Sous régime standard, la délétion du gène *ApoE* altère l'élimination des lipoprotéines plasmatiques, ce qui entraîne une hypercholestérolémie, principalement liée aux remnants de VLDL et de chylomicrons. Même avec une alimentation pauvre en graisse, les souris *ApoE*<sup>-/-</sup> développent rapidement des plaques d'athérosclérose morphologiquement identiques à tous les stades d'athérosclérose chez l'Homme, de la strie lipidique à la plaque fibreuse, avec présence de calcification<sup>185-187</sup>.

De plus, dans les souris *ApoE*<sup>-/-</sup>, les régimes riches en graisse et en cholestérol (tels qu'un régime HFD ou western) accélèrent le processus de développement de l'athérosclérose et exacerbent la sévérité de la pathologie<sup>185-187</sup>.

Même si le modèle *ApoE*<sup>-/-</sup> est utilisé par de nombreux groupes de recherche, il présente certaines limites. En effet, l'ApoE est une protéine multifonctionnelle et, en plus de la clairance des lipoprotéines, elle possède également une activité anti-inflammatoire et anti-oxydante. Elle est impliquée dans le transport inverse du cholestérol, ainsi que la migration et la prolifération de CML. Ces fonctions peuvent impacter le développement de l'athérosclérose indépendamment des concentrations de lipides plasmatiques. De plus, la translation des données obtenues dans le modèle *ApoE*<sup>-/-</sup> chez l'Homme est limitée car la majeure partie du cholestérol plasmatique chez ces animaux est dans la fraction VLDL et non la fraction LDL. Par ailleurs, comme les autres modèles murins d'athérosclérose communément utilisés, les ruptures de plaques et les thromboses sont rares, alors que ces événements sont fréquents chez l'Homme et peuvent entraîner un infarctus du myocarde et/ou un AVC<sup>183,185</sup>.

### **B. Les souris déficientes pour le LDLr (*Ldlr*<sup>-/-</sup>)**

Les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> ont été développées afin de contrecarrer les limites du modèle *ApoE*<sup>-/-</sup>, révélant ainsi quelques avantages. Comme mentionné précédemment, le LDLr est un récepteur membranaire qui permet d'endocyter les LDL riches en cholestérol et de les éliminer au niveau du foie, assurant le maintien des LDL plasmatiques.

Sous régime standard, les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> présentent des taux de cholestérol plasmatique légèrement élevés et ne développent pas d'athérosclérose ou seulement une athérosclérose légère, même à un âge avancé. En ce qui concerne leur profil lipidique plasmatique, les

concentrations de IDL et LDL sont augmentées tandis que les taux de HDL et de TG restent inchangés. Dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>, un régime riche en graisse et en cholestérol entraîne une forte augmentation des concentrations plasmatiques de cholestérol et la formation de lésions d'athérosclérose comparables aux souris *ApoE*<sup>-/-</sup>. La plaque se développe au cours du temps, d'abord dans le sinus aortique et dans l'aorte proximale, puis s'étend vers l'aorte distale. Comme chez l'Homme, les lésions d'athérosclérose sont plus propices de se former là où le flux sanguin est perturbé<sup>183,185-187</sup>.

Comme mentionné précédemment, le modèle *LDLr*<sup>-/-</sup> présente quelques avantages par rapport au modèle *ApoE*<sup>-/-</sup>. Contrairement à l'ApoE, le LDLr n'a pas la même diversité de fonctions et n'impacte pas l'inflammation. De cette manière, le développement de l'athérosclérose dans le modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup> est plutôt basé sur les niveaux de lipides plasmatiques et n'est pas causé par d'autres fonctions liées au LDLr. De plus, le cholestérol plasmatique est principalement transporté par les LDL, ce qui permet de mimer le profil lipidique humain<sup>183,185</sup>.

### **C. Les souris double déficientes pour l'ApoE et le LDLr (*apoE/LDLr-DKO*)**

Les souris *apoE/LDLr-DKO* développent une hyperlipidémie et une athérosclérose plus sévères que les KO simples. Même sous un régime standard, la progression de l'athérosclérose est généralement plus marquée dans les souris *apoE/LDLr-DKO* que dans les souris *ApoE*<sup>-/-</sup>. Elles présentent des niveaux élevés de VLDL et LDL ce qui est similaire aux souris *apoE*<sup>-/-</sup> et une augmentation des apolipoprotéines B48 et B100. Ce modèle de souris peut être utile pour étudier l'athérosclérose et, par conséquent, les médicaments anti-athérosclérotiques, sans avoir besoin d'un régime athérogène<sup>183,185</sup>.

### **D. Les souris *ApoE2KI***

Chez l'Homme, il existe trois isoformes d'ApoE : l'ApoE2, l'ApoE3 et l'ApoE4. Alors que l'ApoE3 est l'isoforme la plus commune, l'isoforme ApoE2 est associée à une altération de la liaison de l'ApoE au LDLr perturbant alors la clairance des lipoprotéines et causant alors une hyperlipoprotéïnémie chez les porteurs de l'ApoE2. De cette manière, en 1998, Sullivan PM *et al.* ont remplacé le gène *ApoE* murin par le gène *ApoE2* humain générant ainsi les souris *ApoE2KI* exprimant l'ApoE2 humaine<sup>188</sup>. Sous régime standard, les souris *ApoE2KI* présentent des concentrations plasmatiques de cholestérol et de TG 2 à 3 fois plus importantes que les souris sauvages. Comme les souris *ApoE*<sup>-/-</sup>, leur profil lipidique est principalement caractérisé

par des chylomicrons et des remnants de VLDL. Un régime riche en graisse et en cholestérol permet d'induire et d'accélérer la progression et le développement de l'athérosclérose, particulièrement présente sous forme de stries lipidiques<sup>189-192</sup>.

### **E. Les souris apoE3.Leiden**

La mutation de l'apoE3.Leiden (découverte et exprimée dans une famille néerlandaise) est associée à une des formes génétiques d'hyperlipidémie. Les souris transgéniques apoE3.Leiden ont été générées, afin d'étudier l'effet de la mutation apoE3.Leiden *in vivo*. Le premier effet de la mutation apoE3.Leiden est une altération de la clairance des chylomicrons et des remnants de VLDL en raison d'une faible affinité de l'apoE3.Leiden pour le LDLr. Même si les souris apoE3.Leiden sont moins sujettes au développement de l'athérosclérose par rapport aux souris *ApoE<sup>-/-</sup>*, lorsqu'elles sont nourries avec un régime riche en graisse et en cholestérol, elles présentent des concentrations plasmatiques de CT et de TG plus élevées. Ce phénomène est principalement associé à une augmentation des VLDL/LDL, ce qui démontre que les souris apoE3-Leiden ont un profil lipidique semblable à celui de l'Homme<sup>183,185</sup>. Il est intéressant de noter que les souris apoE3.Leiden développent des lésions précoces sous régime standard. Par contre, un régime riche en graisse et en cholestérol est nécessaire pour avoir des lésions plus avancées et plus complexes (stries lipidiques, noyau nécrotique et chape fibreuse). L'un des avantages de ce modèle est la synthèse et la présence d'une ApoE fonctionnelle qui offre la possibilité d'étudier l'effet de l'hyperlipidémie sur l'athérosclérose sans perturber les processus inflammatoires. Par contre, l'inconvénient de ce modèle est que, comme les autres modèles, les souris apoE3.Leiden ne présentent pas de rupture de plaque, de formation de thrombus et/ou d'hémorragie<sup>183,185</sup>.

### **F. Les souris AAV-PCSK9**

Parallèlement aux modèles précédemment mentionnés, un nouveau modèle de souris sans modulation génétique est en train d'émerger dans le domaine de la recherche sur l'athérosclérose. Les souris dites adeno associated virus (AAV)-PCSK9 ont été décrites comme modèle murin rapide, adaptable et peu coûteux pour l'athérosclérose. PCSK9 est majoritairement exprimée dans le foie et en se fixant au LDLr à la surface des cellules, il permet de réduire la clairance des LDL plasmatiques en activant la dégradation lysosomale et endosomale du LDLr<sup>183,185</sup>.

Les vecteurs AAV recombinants permettent l'expression de transgènes sur le long terme dans de nombreux modèles animaux et également chez l'Homme. Ils ne provoquent aucun effet indésirable chez les animaux et aucun signe de lésion hépatique ou de réponse immunologique n'est observé. 30 jours après l'infection, les concentrations plasmatiques de cholestérol sont doublées chez les souris transgéniques AAV-PCSK9 par rapport aux souris témoins. Cet effet est resté stable et préservé 1 an après l'infection ce qui confirme l'effet chronique d'une seule injection d'AAV. Un régime riche en graisse et en cholestérol exacerbe cette hypercholestérolémie chez les souris AAV-PCSK9 et leur profil lipidique plasmatique révèle une répartition égale entre les VLDL et les LDL<sup>183,185</sup>. Les souris AAV-PCSK9 développent des lésions d'athérosclérose similaires à celles observées chez les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> progressant jusqu'au stade fibro-athéromateux et même jusqu'à la calcification vasculaire<sup>183,185</sup>. Ce modèle permet ainsi de mener des études sur le développement de l'athérosclérose jusqu'à la calcification en évitant la génération difficile et coûteuse de colonies de souris. Il permet également d'induire de l'hyperlipidémie et de l'athérosclérose chez des animaux ayant des fonds génétiques différents. Par contre, à l'instar des autres modèles murins décrits ci-dessus, la principale limitation de ce modèle est l'absence de rupture spontanée de plaque, principale cause d'événements cardiovasculaires chez l'Homme<sup>183,185</sup>.

D'autres modèles murins d'athérosclérose moins utilisés ont également été pensés et développés généralement sur le principe d'un double KO impliquant des souris *ApoE*<sup>-/-</sup> ou des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>. Parmi ces modèles, on peut retrouver les souris *LDLR/Apobec-1*-DKO ou encore les souris *ApoE*<sup>-/-</sup>*Fbn1*<sup>C1039G+/-</sup><sup>183,185</sup>.

Modèle	Profil lipidique plasmatique	Caractéristiques de la plaque	Avantages	Inconvénients
<b>ApoE<sup>-/-</sup></b>	<b>Cholestérol plasmatique :</b> 400-600 mg/dL (SD) >1000 mg/dL (WD) <b>Lipoprotéines :</b> ↑↑VLDL ↑LDL ↓HDL	<b>Plaque fibreuse :</b> CML, matrice extracellulaire, cellules inflammatoires, noyau nécrotique	Développe de l'athérosclérose sous régime standard	Pas de profil lipidique semblable à l'Homme apoE non fonctionnelle Pas de rupture de plaque et de thrombose
<b>Ldlr<sup>-/-</sup></b>	<b>Cholestérol plasmatique :</b> 200-300 mg/dL (SD) >1000 mg/dL (WD) <b>Lipoprotéines :</b> ↑VLDL ↑↑LDL =HDL	<b>Plaque fibreuse :</b> CML, matrice extracellulaire, cellules inflammatoires, noyau nécrotique	Profil lipidique semblable à l'Homme (LDL) apoE fonctionnelle Caractéristiques de l'HF	WD nécessaire pour développer des lésions complexes Pas de rupture de plaque et de thrombose
<b>apoE/LDLr-DKO</b>	<b>Cholestérol plasmatique :</b> 400-600 mg/dL (SD) >1000 mg/dL (WD) <b>Lipoprotéines :</b> ↑↑VLDL ↑↑LDL ↓HDL	<b>Plaque fibreuse :</b> CML, matrice extracellulaire, cellules inflammatoires, noyau nécrotique	Développe de l'athérosclérose sous régime standard	Pas de rupture de plaque et de thrombose
<b>ApoE2KI</b>	<b>Cholestérol plasmatique :</b> 200-300 mg/dL (SD) >1000 mg/dL (WD) <b>Lipoprotéines :</b> ↑↑VLDL ↑LDL ↓HDL	<b>Plaque fibreuse :</b> CML, matrice extracellulaire, cellules inflammatoires, noyau nécrotique	Développe de l'athérosclérose sous régime standard apoE fonctionnelle	Pas de profil lipidique semblable à l'Homme Pas de rupture de plaque et de thrombose
<b>apoE3.Leiden</b>	<b>Cholestérol plasmatique :</b> 100-200 mg/dL (SD) >1000 mg/dL (WD) <b>Lipoprotéines :</b> ↑↑VLDL ↑LDL ↑HDL (WD seulement)	<b>Plaque fibreuse :</b> CML, matrice extracellulaire, cellules inflammatoires, noyau nécrotique	apoE fonctionnelle	WD nécessaire pour développer des lésions complexes Pas de rupture de plaque et de thrombose
<b>PCSK9-AAV</b>	<b>Cholestérol plasmatique :</b> 400-600 mg/dL (SD) >1000 mg/dL (WD) <b>Lipoprotéines :</b> ↑VLDL (WD seulement) ↑LDL =HDL	<b>Plaque fibreuse :</b> CML, matrice extracellulaire, cellules inflammatoires, noyau nécrotique	Pas de modulation génétique	WD nécessaire pour développer des lésions complexes Pas de rupture de plaque et de thrombose

**Tableau 6 : Aperçu des modèles murins couramment utilisés pour étudier le développement de l'athérosclérose, d'après Emini Veseli et al., 2017<sup>183</sup>**



## PARTIE 6 : PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR $\alpha$

Les PPARs sont des facteurs de transcription activés par des ligands appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Trois isotypes de PPARs ont été identifiés : PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta/\delta$  (NR1C2), and PPAR $\gamma$  (NR1C3). Le premier membre de la famille PPAR, PPAR $\alpha$ , a été identifié en 1990 et les deux autres isotypes, PPAR $\beta/\delta$  et PPAR $\gamma$ , ont été ensuite identifiés par homologie de séquence. Ils sont codés par des gènes distincts situés sur différents chromosomes et partagent une importante homologie de séquence et de structure. Cependant, les PPARs présentent une expression différente selon les tissus et ils possèdent des ligands spécifiques<sup>193–195</sup>.

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé l'isoforme PPAR $\alpha$  comme outil de modulation de la MASLD et de l'athérosclérose.

### I. Généralités

PPAR $\alpha$  a été identifié chez l'Homme et dans d'autres espèces animales telles que la souris ou le rat. Chez l'Homme et la souris, PPAR $\alpha$  est localisé sur le chromosome 22 et le chromosome 15 respectivement. Les deux gènes humain et murin codent pour 468 acides aminés avec une homologie de 91%. Comme chez la souris, le PPAR $\alpha$  humain présente une organisation classique comprenant huit exons avec une région 5' non traduite (untranslated region, UTR) codée par les exons 1, 2 et une partie de l'exon 3. Le reste de l'exon 3 et les exons 4 à 8 contribuent à la région codante de PPAR $\alpha$ . Les 232 dernières paires de base (pb) de l'exon 8 contribuent à la région 3' UTR (Figure 17). Chez l'Homme, plusieurs polymorphismes de PPAR $\alpha$  existent tels que le polymorphisme L162V ou V227A<sup>194,195</sup>.

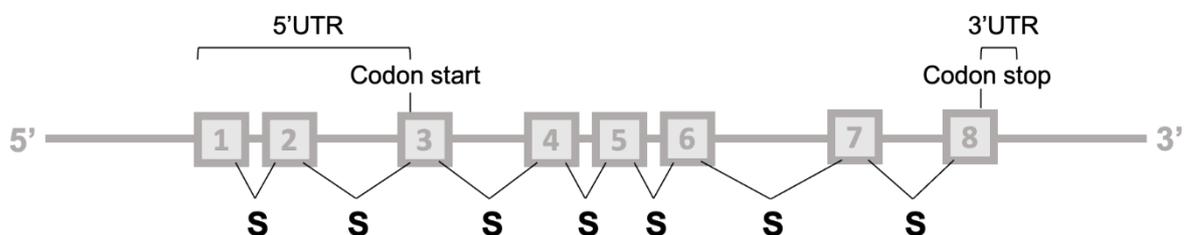
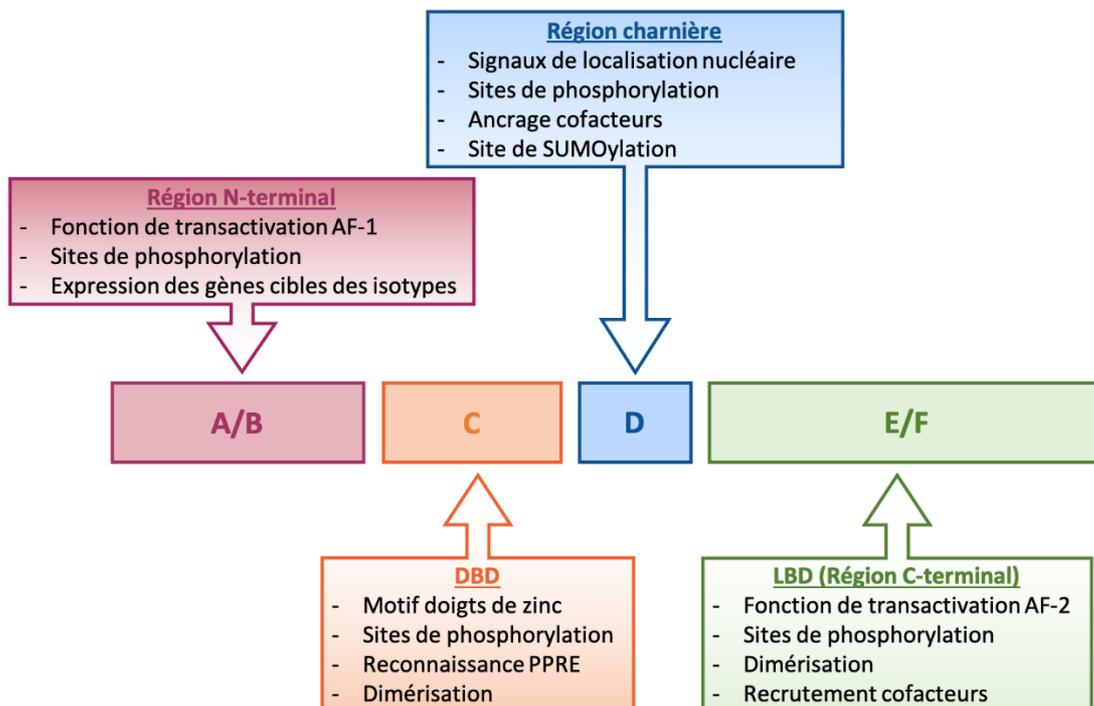


Figure 17 : Représentation schématique du gène PPAR $\alpha$  humain, d'après Bougarne et al., 2018<sup>195</sup>

## II. Structure

De la même manière que les autres récepteurs nucléaires et les autres isotopes de PPAR, la protéine PPAR $\alpha$  possède 4 domaines fonctionnels (**Figure 18**)<sup>193-195</sup> :

- Le **domaine A/B** dans la région N-terminal composé de la région activated function (AF)-1 indépendante du ligand, qui est importante pour l'activité transcriptionnelle de PPAR $\alpha$ .
- Le **domaine C** central de liaison à l'ADN (DNA binding domain, DBD) constitué de deux motifs doigts de zinc qui permet à PPAR $\alpha$  de reconnaître les éléments de réponse PPAR (Peroxisome proliferator response element, PPRE) localisés sur ses gènes cibles et de se lier à l'ADN.
- Une région charnière flexible : le **domaine D** qui interagit avec les cofacteurs de PPAR $\alpha$ .
- Le **domaine E** situé en région C-terminale de liaison au ligand (ligand binding domain, LBD) : il contient une région AF-2 dépendante du ligand et possède une structure composée d'un sandwich d'hélices  $\alpha$  et d'un feuillet  $\beta$  à quatre brins, formant une cavité en forme de Y appelée poche de liaison au ligand (ligand binding pocket, LBP). Le domaine E permet également à PPAR $\alpha$  d'interagir avec ses cofacteurs.



**Figure 18 :** Représentation schématique de la protéine PPAR $\alpha$  d'après Bougarne et al., 2018<sup>195</sup>

### III. Profil d'expression

PPAR $\alpha$  est majoritairement exprimé dans les tissus présentant un taux élevé d'oxydation des AG tels que le foie, le cœur, les muscles et les reins, et fonctionne comme un régulateur majeur de l'homéostasie lipidique.

Chez l'Homme, PPAR $\alpha$  est majoritairement exprimé dans le foie<sup>196</sup>. PPAR $\alpha$  est également présent dans le pancréas, les reins, le tube digestif, les kératinocytes, le pancréas et le cerveau<sup>193,195,197</sup>. De plus, PPAR $\alpha$  est également trouvé au sein des lésions d'athéroscléroses, dans les cellules de la paroi vasculaire comme les CML et les cellules endothéliales et également les cellules immunitaires telles que les monocytes/macrophages<sup>193,195</sup>.

Les rongeurs présentent le même profil d'expression de PPAR $\alpha$  que l'Homme avec un niveau d'expression majoritaire dans le foie mais largement supérieur au niveau d'expression hépatique chez l'Homme<sup>196</sup>. On le retrouve également très exprimé au niveau du cœur, des reins, des muscles et du tissu adipeux brun. PPAR $\alpha$  est également présent dans l'intestin, le pancréas, les testicules, les ovaires, le cerveau et dans les cellules de la plaque d'athérosclérose<sup>195,193,197</sup>.

Généralement, le PPAR $\alpha$  actif est principalement localisé dans le noyau. Cependant, plusieurs études ont également montré que PPAR $\alpha$  pouvait être présent dans le cytoplasme de plusieurs types cellulaires différents, soulignant le transport dynamique de PPAR $\alpha$  entre le noyau et le cytosol. Ce transport nucléaire est d'ailleurs influencé par un signal calcique et par la liaison du ligand sur PPAR $\alpha$ <sup>195</sup>.

### IV. Ligands de PPAR $\alpha$

#### A. *Ligands naturels*

PPAR $\alpha$  peut être activé par de nombreuses molécules endogènes et/ou naturelles comprenant une grande variété d'AG saturés, mono- ou poly-insaturés (acide palmitique, acide oléique, acide linoléique et acide arachidonique) et de dérivés d'AG y compris les eicosanoïdes comme l'acide 8(S)-hydroxyeicosatetraenoïque (HETE) ou le 20-HETE provenant de l'oxydation de l'acide arachidonique, ou le leucotriène B4 (LTB4). Ces AG et leurs métabolites qui interagissent avec PPAR $\alpha$  peuvent provenir de l'alimentation ou être obtenus par synthèse *de novo*. De plus, PPAR $\alpha$  peut être activé par des phospholipides comme la phosphatidylcholine et, par d'autres composés naturels tels que le resveratrol<sup>194,195</sup>.

### B. Ligands synthétiques

Les ligands synthétiques de PPAR $\alpha$  sont appelés fibrates. Parmi eux, on retrouve le gemfibrozil, le clofibrate, le bézafibrate, le ciprofibrate ou encore le fénofibrate. Les fibrates sont couramment utilisés en clinique dans le traitement pharmacologique de l'hypertriglycéridémie. D'autres molécules dont l'utilisation n'est pas autorisée en clinique mais souvent utilisés en recherche pré-clinique pour activer PPAR $\alpha$  ont également été développées : le Wy 14,643, le GW9578 et le GW7647<sup>194,195,198</sup>.

### C. Modulateurs sélectifs de PPAR $\alpha$

Chez l'Homme, les fibrates ont une faible affinité pour PPAR $\alpha$  et leur utilisation clinique est de plus en plus contestée en raison d'effets indésirables musculaires, digestifs ou rénaux. Une nouvelle génération de SPPAR $\alpha$  a été développée afin de maximiser le potentiel thérapeutique de PPAR $\alpha$  en tant que cible médicamenteuse. Parmi eux, le pemafibrate (K-877, Parmodia<sup>®</sup>), développé par l'entreprise japonaise *Kowa*, est autorisé depuis 2017 au Japon pour la prise en charge de la dyslipidémie. Grâce à sa structure en Y, sa plus longue chaîne carbonée et ses nombreuses interactions hydrogène et  $\pi$ , parfaitement adapté au LBD de PPAR $\alpha$ , le pemafibrate est 2500 fois plus puissant que le fénofibrate et il est 5000 fois plus actif sur PPAR $\alpha$  que sur les autres isoformes PPAR $\beta/\delta$  et PPAR $\gamma$  (Figure 19). Chez l'homme, seul ou associé aux statines, le pemafibrate diminue les taux plasmatiques de TG et augmente les taux de HDL-C de manière plus importante qu'un fibrate classique (comme le fénofibrate par exemple) et sans les effets indésirables classiquement observés<sup>199-201</sup>.

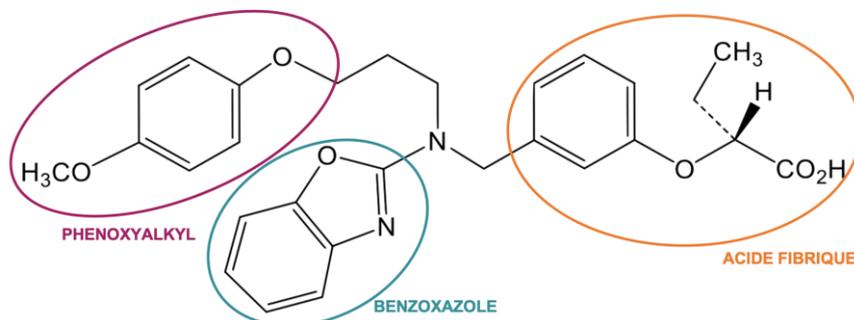


Figure 19 : Structure chimique du pemafibrate

## V. Mécanismes d'action de PPAR $\alpha$

### A. Mécanisme de transactivation dépendant de l'ADN

PPAR $\alpha$  peut venir s'hétérodimériser avec le Retinoid X Receptor (RXR). L'hétérodimère PPAR $\alpha$ -RXR reconnaît et se lie aux PPRE localisés sur les gènes cibles de PPAR $\alpha$  et organisés sous la forme d'une séquence direct repeat type 1 (DR-1) (Figure 20). DR-1 est constituée de deux copies du motif 5'-AGGTCA-3' séparées par un seul nucléotide. Un autre motif AACT est positionné en 5' du DR-1. La liaison au PPRE se fait de telle manière que PPAR $\alpha$  se lie au demi-site en 5' tandis que RXR occupe le demi-site 3'<sup>195</sup>.

Les hétérodimères PPAR $\alpha$ -RXR peuvent se former indépendamment de la liaison de son ligand à PPAR $\alpha$ . En effet, en l'absence de ligands spécifiques, les hétérodimères PPAR $\alpha$ -RXR se lient au PPRE et recrutent des corépresseurs tels que nuclear receptor corepressor (NCoR) ou le silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT), inhibant ainsi la transcription des gènes cibles. Lors de l'activation par un ligand, les corépresseurs sont libérés des hétérodimères PPAR $\alpha$ -RXR et les coactivateurs comme le PPAR $\gamma$  coactivator (PGC)-1 $\alpha$ , cAMP response element binding protein (CBP)/p300 et le steroid receptor coactivator-1 (SRC-1), sont alors recrutés, induisant l'expression de gènes cibles impliqués dans plusieurs processus biologiques, notamment le métabolisme des lipides<sup>194,195</sup>.

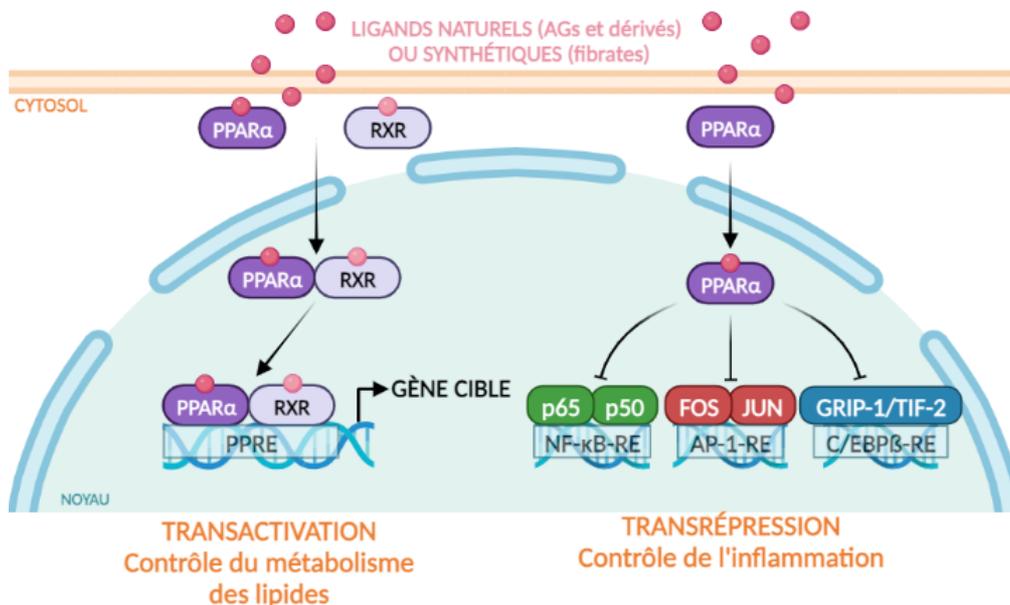


Figure 20 : Mécanismes d'action de PPAR $\alpha$

### ***B. Mécanisme de transrépression indépendant de l'ADN***

PPAR $\alpha$  est également capable de réguler négativement les voies de signalisation pro-inflammatoire indépendamment de la fixation à l'ADN, par le biais direct d'interaction protéine-protéine. Une fois activé par un ligand, PPAR $\alpha$  peut interférer avec la voie de signalisation Activator protein-1 (AP-1) et NF- $\kappa$ B (**Figure 20**). Ce mécanisme de transrépression implique des interactions physiques directes entre PPAR $\alpha$ , le domaine Rel p65 de NF- $\kappa$ B et la partie N-terminal de c-Jun, JNK, qui forme avec c-Fos le complexe AP-1. PPAR $\alpha$  peut également interférer avec la voie de signalisation signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) et la voie de signalisation CCAAT-enhancer-binding protein beta (C/EBP $\beta$ ) via son interaction avec la GR-interactin protein-1/transcription intermediary factor-2 (GRIP-1/TIF-2)<sup>194,195</sup>.

## **VI. Modulation de l'activité de PPAR $\alpha$**

### ***A. Modulation de l'expression du gène et de la protéine PPAR $\alpha$***

L'expression du gène PPAR $\alpha$  est contrôlée par divers paramètres physiologiques comme le stress, les glucocorticoïdes, le rythme circadien, l'hormone de croissance, l'insuline ou la leptine<sup>195</sup>.

Par ailleurs, l'expression de PPAR $\alpha$  est augmentée pendant le jeûne, ce qui entraîne également une augmentation de l'expression de ses gènes cibles pour activer l'oxydation des AG et former des substrats qui peuvent être métabolisés par d'autres tissus<sup>195</sup>. Plus spécifiquement, il a été montré que l'activité du PPAR $\alpha$  hépatocytaire est nécessaire au maintien de l'homéostasie lipidique en réponse au jeûne<sup>181</sup>.

De plus, l'expression de PPAR $\alpha$  peut également être influencée par l'âge. En effet, plusieurs études ont montré une diminution de l'expression de PPAR $\alpha$  et de ses gènes cibles liée au vieillissement<sup>195</sup>.

De manière intéressante, les concentrations de métabolites tels que le glucose et ses dérivés, ou les acides biliaires, peuvent également influencer l'expression de PPAR $\alpha$ .

Il a également été montré que les cytokines impliquées dans la voie NF- $\kappa$ B telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 ou le TNF- $\alpha$ , répriment l'expression génique et protéique de PPAR $\alpha$ <sup>195</sup>.

L'expression et l'activité de PPAR $\alpha$  peut également être contrôlée par ses ligands. Par exemple, certains ligands synthétiques de PPAR $\alpha$  prolongent sa demi-vie et le ce qui empêche son ubiquitination et par la suite, sa dégradation par le protéasome. De plus, il a été montré que les agonistes de PPAR $\alpha$  augmentent fortement les niveaux d'expression du PPAR $\alpha$  humain

ainsi que l'activité de son promoteur, ce qui suggère que PPAR $\alpha$  autorégule positivement sa propre expression<sup>195</sup>.

Pour finir, la présence ou l'absence d'autres facteurs de transcription comme Krüppel-like factor 6 (KLF6), hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4), chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (COUP-TFII), liver X receptor (LXR) ou encore pregnane X receptor (PXR) peuvent également réguler l'expression et l'activité de PPAR $\alpha$ . De manière plus générale, les récepteurs nucléaires capables de s'hétérodimériser avec RXR, représentent des compétiteurs de PPAR $\alpha$ , surtout dans les tissus où la quantité de RXR est limitée<sup>195</sup>.

### ***B. Importance des cofacteurs de PPAR $\alpha$***

Comme pour les autres récepteurs nucléaires, l'activité de PPAR $\alpha$  est régulée par la présence de cofacteurs qui, en fonction du contexte, agissent comme des coactivateurs ou des corépresseurs. En l'absence de ligand, PPAR $\alpha$  se lie à des corépresseurs comme SMRT ou NCoR qui stabilise PPAR $\alpha$  en réduisant son ubiquitination. PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$ , CBP/p300, SRC-1, PPAR-interacting protein, PPAR-binding protein (PBP/TRAP220/DRIP250/MED1) ou encore coactivator-associated proteins PIMT (NCoA6IP) et coactivator-associated arginine methyltransferase-1 (CARM1) sont des coactivateurs connus impliqués dans l'hétérodimère PPAR $\alpha$ /RXR. La plupart de ces cofacteurs ne sont pas exclusifs à PPAR $\alpha$ , mais certains coactivateurs sont essentiels pour l'activité de PPAR $\alpha$ . Par exemple, la déficience en PBP/MED1 dans le foie entraîne la suppression des effets pléiotropes des ligands de PPAR $\alpha$ , ce qui indique que PBP/MED1 est essentiel pour la fonctionnalité de PPAR $\alpha$ <sup>195</sup>.

### ***C. Modulation de l'activité de PPAR $\alpha$ par des modifications post-transcriptionnelles***

De la même manière que les autres récepteurs nucléaires, PPAR $\alpha$  peut subir des modifications post-transcriptionnelles comme la phosphorylation, l'ubiquitination ou la SUMOylation.

#### **1. La phosphorylation**

PPAR $\alpha$  est une phosphoprotéine dont l'activité transcriptionnelle peut être modulée par plusieurs kinases dont les Mitogen-activated protein kinases (MAPK), la c-Jun N-terminal kinase/p38 (MAPK38), les AMP-activated protein kinase (AMPK), la protéine kinase A (PKA), la PKC, et la Glycogène synthase kinase 3 (GSK3) (**Tableau 7**). Les effets de la phosphorylation

sur l'activité de PPAR $\alpha$  dépendent d'un certain nombre de caractéristiques, telles que la nature du résidu modifié, ainsi que du stimulus et de la kinase impliquée<sup>195</sup>.

Kinase	Résidus phosphorylés	Effets sur l'activité transcriptionnelle	Effets physiologiques
<b>ERK1/2 MAPK</b>	Sérines 12 et 21 dans le domaine A/B du PPAR $\alpha$ humain	Augmente la transactivation induit par un ligand	Interaction entre la signalisation de l'insuline et l'activité de PPAR $\alpha$
<b>P38 MAPK</b>	Sérines 6, 12 et 21 dans le domaine A/B du PPAR $\alpha$ murin	Augmente la transactivation induit par un ligand	Augmente la $\beta$ -oxydation mitochondriale cardiaque pendant les périodes de stress
<b>ERK MAPK</b>	Sérines 6, 12 et 21 dans le domaine A/B du PPAR $\alpha$ murin	Diminue la transactivation	Diminue PPAR $\alpha$ et ses gènes cibles au cours de la croissance hypertrophique des myocytes cardiaques
<b>PKC</b>	Sérines 179 et 230 dans le domaine D du PPAR $\alpha$ humain	Augmente la transactivation Diminue la transrépression	Changement moléculaire dissociant les fonctions de transactivation et de transrépression de PPAR $\alpha$
<b>PKA</b>	Majoritairement dans le domaine D	Augmente la transactivation induit par un ligand	Augmente la $\beta$ -oxydation, la production de glucose et de corps cétoniques en situation de stress, de jeûne ou d'exercice
<b>AMPK</b>	Non déterminés	Augmente la transactivation	Augmente l'expression de PPAR $\alpha$ et des gènes d'oxydation des AG dans le muscle squelettique
<b>GSK3</b>	Sérine 73 dans le domaine A/B	Diminue la stabilité de PPAR $\alpha$	Relie la signalisation GSK3 et l'activité PPAR $\alpha$ à la régulation du métabolisme

**Tableau 7 : Modifications par phosphorylation régulant l'activité de PPAR $\alpha$ , d'après Bougarne et al., 2018<sup>195</sup>**

## **2. L'ubiquitination**

L'ubiquitination implique la conjugaison d'une petite protéine, l'ubiquitine, à la protéine d'intérêt par l'action de plusieurs enzymes afin de programmer sa dégradation par le protéasome 26s. Les effets de la dégradation de PPAR $\alpha$  sur son activité transcriptionnelle sont toujours en discussion. En effet, Blanquart *et al.* ont montré une corrélation inverse entre la dégradation de PPAR $\alpha$  et son activité<sup>202</sup>, ce qui est en contradiction avec les résultats obtenus par Burns et Vanden Heuvel<sup>203</sup>.

De plus, il a récemment été montré dans notre laboratoire que le leukocyte antigen-F Adjacent Transcript 10 (FAT10) humain, aussi connu sous le nom d'ubiquitine D (UBD), diminuait l'activité métabolique de PPAR $\alpha$  en réponse au jeûne ou à un agoniste<sup>204</sup>.

### **3. La SUMOylation**

PPAR $\alpha$  peut également subir des modifications par la SUMOylation qui est une modification réversible impliquant la fixation covalente de petites protéines modificatrices liées à l'ubiquitine (small ubiquitin-related modifier, SUMO) par l'intermédiaire d'enzymes spécifiques. Il a été montré que le PPAR $\alpha$  murin peut être SUMOylé au niveau du résidu lysine 358 et agit comme un régulateur positif de l'activité de transrépression de PPAR $\alpha$ <sup>205</sup>. Le PPAR $\alpha$  humain peut également subir une SUMOylation par SUMO-1 au niveau du résidu lysine 185 dans la région charnière, ce qui entraîne une diminution de son activité de transactivation via le recrutement du corépresseur NCoR<sup>206</sup>. Cette SUMOylation est diminuée en présence de ligand de PPAR $\alpha$ .

## **VII. Principaux gènes cibles de PPAR $\alpha$ et leurs fonctions**

### ***A. Gènes cibles de PPAR $\alpha$ impliqués dans le métabolisme des lipides***

Comme mentionné précédemment, PPAR $\alpha$  exerce ses fonctions principalement sur le métabolisme des lipides, et essentiellement au niveau du foie. En effet, PPAR $\alpha$  facilite la capture des AG libres présents dans la circulation en augmentant l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport des AG (présents à la surface des hépatocytes mais également des cellules stellaires et des cellules de Kupffer). Parmi ces transporteurs, on retrouve les FATP et CD36 ainsi que les FABP qui permettent également le trafic intracellulaire de ces AG. Une fois entrés dans la cellule, les AG sont estérifiés par l'ACS afin de les empêcher de sortir de la cellule. Par la suite, l'activation de PPAR $\alpha$  induit l'expression de CPT-1 et CPT-2 qui permettent l'entrée des AG dans la mitochondrie. Les AG vont alors être dégradés par  $\beta$ -oxydation mitochondriale grâce à l'induction de la medium chain acylCoa dehydrogenase (MCAD), de la long chain acylCoa dehydrogenase (LCAD), de la very long chain acylCoa dehydrogenase (VLCAD) par PPAR $\alpha$ . Cette  $\beta$ -oxydation conduit à la formation d'acetyl-CoA qui peut être utilisé ensuite par le cycle de Krebs pour fournir de l'énergie ou par exemple dans la cétogénèse pour former des corps cétoniques, sources énergétiques utilisés par les tissus périphériques en situation de jeûne. Cette réaction est catalysée par des enzymes telles que

HMG-CoA synthase qui est également régulée par PPAR $\alpha$ . PPAR $\alpha$  régule également FGF21 qui est une hépatokine induite en réponse à un jeûne et favorise la céto-genèse ainsi que l'oxydation des lipides<sup>207</sup>. La dégradation des AG peut également se faire par  $\beta$ -oxydation au niveau des peroxyosomes et est également régulée par PPAR $\alpha$  en induisant l'expression de gènes comme ACOX et l'enzyme bifonctionnelle (BIEN). Il existe également un phénomène de  $\omega$ -oxydation microsomale catalysé par les cytochromes P450 4A (CYP4A) également induits par PPAR $\alpha$ . Par ailleurs, il a été montré que plusieurs gènes impliqués dans la lipogénèse, tels que la fatty acid desaturase 2 (FADS2), SCD1 ou la lipine 2 possèdent un PPRE et sont régulés indirectement via SREBP1c par PPAR $\alpha$ . Dans la lipogénèse, PPAR $\alpha$  peut également induire l'expression d'ACC et de FAS<sup>193–195,208</sup>.

Par ailleurs, le stockage des lipides dans le foie se fait principalement sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes. PPAR $\alpha$  régule des gènes codant pour des lipases, comme PNPLA2 ou la lipase E, qui interviennent dans la formation des gouttelettes lipidiques, mais également des gènes impliqués dans la stabilisation de ces gouttelettes lipidiques comme certaines périlipines<sup>193–195,208</sup>.

De plus, PPAR $\alpha$  intervient également dans l'assemblage des VLDL au niveau du foie puisqu'il induit l'expression de MTP ainsi que l'expression de l'apoB. En parallèle, PPAR $\alpha$  augmente également le catabolisme des lipoprotéines riches en TG en se fixant au PPRE de la LPL et en l'activant au niveau du foie mais aussi dans la circulation<sup>193–195,208</sup>. PPAR $\alpha$  augmente également l'expression de l'apoAV qui active cette LPL, augmentant ainsi l'activité lipolytique périphérique<sup>209</sup>. A l'inverse, PPAR $\alpha$  régule négativement l'expression de l'apoCIII, qui agit comme un inhibiteur de la LPL<sup>210</sup>.

Il a également été montré que PPAR $\alpha$  régule le métabolisme hépatique du cholestérol et de la bile via l'induction ou la répression de plusieurs gènes tels que ABCG5, ABCG8, CYP27A1 ou CYP7A1<sup>195,208</sup>. Il intervient également dans le métabolisme des acides aminés puisqu'il est capable de diminuer l'expression de gènes impliqués dans la transamination et la désamination<sup>208</sup>.

Par ailleurs, PPAR $\alpha$  intervient également dans le métabolisme du HDL-C. Chez l'Homme, PPAR $\alpha$  augmente les concentrations plasmatiques de HDL-C en augmentant leur deux apolipoprotéines majeures, apoAI et apoAII qui possèdent un PPRE dans leur promoteur<sup>211,212</sup>. Par contre, chez les rongeurs, PPAR $\alpha$  régule négativement les concentrations plasmatiques de

HDL-C et d'apoAI, mais il augmente les concentrations plasmatiques d'apoAII<sup>213-215</sup>. De plus, PPAR $\alpha$  induit également l'expression de ABCA1 et de SR-B1 dans les macrophages, impliqués dans l'efflux de cholestérol<sup>193-195,208</sup>.

### ***B. Gènes cibles de PPAR $\alpha$ impliqués dans le métabolisme des glucides***

Plusieurs études ont montré que PPAR $\alpha$  jouait un rôle dans l'homéostasie du glucose : plusieurs gènes impliqués notamment dans la néoglucogénèse ont été identifiés comme des cibles de PPAR $\alpha$ . Parmi ces gènes, on retrouve la phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1), la pyruvate carboxylase (PCX) et la lactate déshydrogénase A<sup>208,195</sup>. L'expression de la glycerol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH) qui permet de convertir le glycérol en glucose lors d'un jeûne et l'expression des transporteurs aquaporines 3 et 9 sont également sous le contrôle de PPAR $\alpha$ <sup>193,195,208</sup>. Par ailleurs, PPAR $\alpha$  peut également altérer l'utilisation du glucose dans de nombreux tissus via l'induction de la pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4 (PDK4)<sup>195,208</sup>.

### ***C. Gènes cibles de PPAR $\alpha$ impliqués dans l'inflammation***

Comme mentionné précédemment, en plus de son implication dans le métabolisme des lipides et des glucides, PPAR $\alpha$  peut directement interférer avec des voies de signalisation liées à l'inflammation telles que NF- $\kappa$ B, AP-1 ou C/EBP $\beta$ . De cette manière, il est capable de réguler l'expression d'une grande variété de cytokines pro- et anti-inflammatoires telles que MCP-1 (aussi appelée CC chemokine ligand (CCL) 2), l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-18, le TNF- $\alpha$  ou encore l'interféron (IFN)- $\gamma$ , au niveau hépatique mais également dans certains types cellulaires impliqués dans la formation des plaques d'athérosclérose. De plus, l'activation de PPAR $\alpha$  permet de diminuer l'expression hépatique de protéines impliquées dans la réponse inflammatoire aigue telles que la CRP, la sérum amyloïde  $\alpha$  (SAA), l'haptoglobine, le fibrinogène  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , la lipocaline 2 et le complément C3<sup>193-195,216</sup>. Par ailleurs, l'activation de PPAR $\alpha$  peut conduire à la diminution de l'expression de VCAM-1 et ICAM-1 dans les cellules endothéliales, plus particulièrement au niveau de l'aorte, renforçant l'hypothèse d'un effet bénéfique de PPAR $\alpha$  sur l'inflammation systémique, notamment sur la paroi vasculaire<sup>193-195</sup>. L'activation de PPAR $\alpha$  est également capable d'inhiber l'expression du vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) via une augmentation de son interaction avec le facteur de transcription specificity protein 1 (SP1). Il est intéressant de noter que les effets anti-

inflammatoires de PPAR $\alpha$  peuvent également provenir de sa capacité à réguler la transcription de certains gènes. En effet, en plus de diminuer l'expression de gènes pro-inflammatoires, PPAR $\alpha$  peut également directement activer l'expression de gènes anti-inflammatoires comme l'interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA), l'I $\kappa$ B $\alpha$  connue pour inhiber NF- $\kappa$ B, ainsi que la vanine-1. Ce phénomène suggère une coopération de l'activité de transactivation de PPAR $\alpha$ , en plus de son activité de transrépression, dans ses effets anti-inflammatoires<sup>194,195,216</sup>.

### VIII. Indications cliniques des fibrates

Les fibrates sont indiqués dans le cas d'une hypertriglycéridémie sévère (type IV et V) associée dans la plupart des cas à un faible taux d'HDL-C. En effet, chez l'Homme, les fibrates sont capables de diminuer les concentrations plasmatiques de TG et d'augmenter celles en HDL-C. Ils peuvent également être utilisés dans le cas d'une hyperlipidémie mixte (augmentation à la fois du cholestérol et des TG plasmatique) lorsqu'une statine est contre-indiquée ou non tolérée, ou chez les patients à risque cardiovasculaire élevé, en association à une statine lorsque les taux de TG et de HDL-C ne sont pas contrôlés.

### IX. PPAR $\alpha$ et MASLD

#### A. *Activités biologiques de PPAR $\alpha$ dans la MASLD*

PPAR $\alpha$  est majoritairement exprimé dans le foie. Son implication dans le métabolisme des lipides grâce à son activité de transactivation, ainsi que ses propriétés anti-inflammatoires qui lui sont conférées par son activité de transrépression, font de PPAR $\alpha$  une cible intéressante dans le traitement de la MASLD. Son rôle dans cette pathologie a pu être mis en évidence grâce à l'utilisation d'agonistes de PPAR $\alpha$  et de modèles animaux déficients pour PPAR $\alpha$ . Un résumé des effets protecteurs de PPAR $\alpha$  dans la MASLD est résumé dans la **figure 21**.

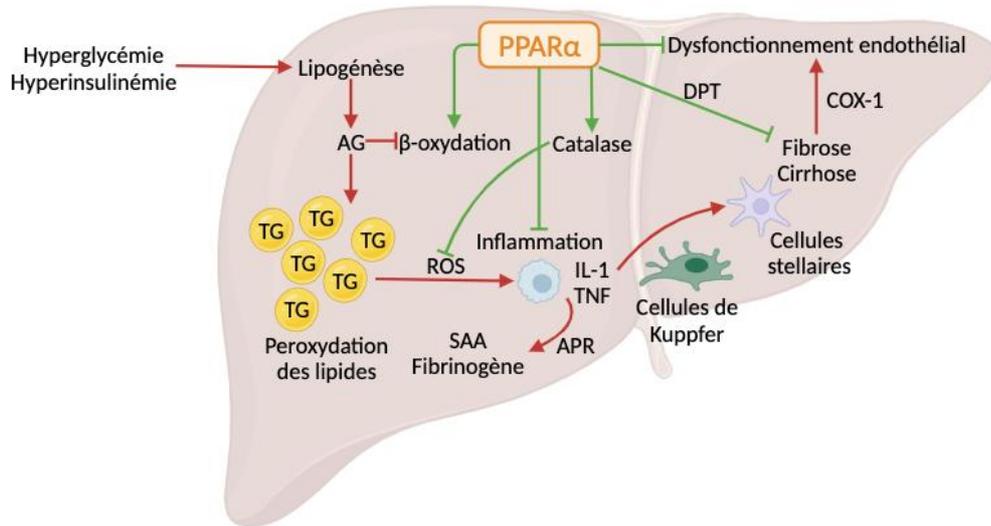
Tout d'abord, plusieurs études pré-cliniques chez la souris ont montré que la déficience totale en PPAR $\alpha$  induit une stéatose hépatique plus sévère par rapport aux souris sauvages<sup>217-220</sup>. Cette stéatose s'accompagne d'une diminution de l'expression hépatique de gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation des AG<sup>218</sup>, et d'une augmentation des marqueurs de stéatose, de stress oxydatif et d'inflammation<sup>217</sup>. Ces études ont été confirmées plus récemment dans des souris déficientes pour PPAR $\alpha$  uniquement dans les hépatocytes<sup>180</sup>. De plus, le traitement par un agoniste PPAR $\alpha$  améliore l'état pathologique de la MASLD dans de nombreux modèles précliniques. Par exemple, chez des souris nourries au MCD, le Wy 14,643 restaure les

changements histologiques au niveau du foie observés avec le régime MCD (stéatose, fibrose). Cette amélioration histologique est accompagnée d'une diminution des lipides et des lipides peroxydés hépatiques, du nombre de macrophages, du nombre de cellules stellaires activées et de l'expression de gènes impliqués dans la fibrogénèse<sup>221</sup>. De plus, une autre étude a également montré que le Wy 14,643 activait la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomale ainsi que la  $\omega$ -oxydation microsomale<sup>219</sup>. Dans le modèle murin *foz/foz*, l'activation pharmacologique de PPAR $\alpha$  avec le Wy 14,643 améliore la condition hépatique en diminuant la stéatose, le ballooning et l'inflammation, et améliore la sensibilité à l'insuline<sup>222</sup>. D'autres études dont certaines menées au laboratoire sur des souris *ApoE2KI* nourries avec un régime western ont montré que le fénofibrate protège du développement de la MASH grâce à l'inhibition de gènes pro-inflammatoires, conduisant à une diminution de l'accumulation des macrophages hépatiques, et à une augmentation du catabolisme des lipides dans le foie<sup>191,223</sup>. Plus récemment, une étude de Honda Y *et al.* sur le modèle de souris *db/db* a montré que le pemafibrate améliore la MASH en régulant le métabolisme hépatique des lipides et l'homéostasie énergétique<sup>224</sup>. De plus, dans un modèle de souris STAM, le pemafibrate améliore la sévérité histologique de la MASH. Cette amélioration est accompagnée d'une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'hydrolyse des TG, la  $\beta$ -oxydation des AG, la lipolyse ainsi que la formation des gouttelettes lipidiques. Par ailleurs, le pemafibrate diminue l'expression de VCAM-1, de marqueurs de cellules myéloïdes, et de gènes liés à l'inflammation et à la fibrose<sup>225</sup>.

De manière intéressante, grâce à un mutant de PPAR $\alpha$  exerçant seulement l'activité de transrépression de PPAR $\alpha$ , il a été montré au laboratoire que l'activation spécifique de la transrépression de PPAR $\alpha$  est nécessaire et suffisante pour inhiber le développement de la MASH et de la fibrose via un mécanisme anti-inflammatoire direct indépendant de ses propriétés hypolipémiantes<sup>179</sup>. Concernant la fibrose, il a également été démontré que l'expression de PPAR $\alpha$  est inversement corrélée à l'expression de la dermatopontine (DPT) impliquée dans le développement de la fibrose<sup>226</sup>. PPAR $\alpha$  semble ainsi avoir un effet anti-fibrotique via la régulation de la DPT dépendante de son activité de transrépression.

Par ailleurs, des études pré-cliniques chez le rat ont pu montrer que l'activation de PPAR $\alpha$  induit directement l'expression de la catalase ce qui augmente la détoxification du peroxyde

d'hydrogène et protège les hépatocytes du stress oxydatif<sup>227</sup>. En outre, les fibrates améliorent la dysfonction endothéliale en réduisant l'expression de la protéine cyclooxygénase (COX)-1<sup>228</sup>.



**Figure 21 : Effets hépatoprotecteurs de l'activation de PPARα dans le développement de la MASLD d'après Pawlak et al., 2015<sup>194</sup>**

### **B. Fibrates et MASLD chez l'Homme**

Chez l'Homme, quelques études assez anciennes et impliquant de petites cohortes ont évalué le potentiel thérapeutique des fibrates dans le développement de la MASLD. Les résultats montrent un effet relativement minime du fénofibrate, gemfibrozil et clofibrate dans la MASLD et sont assez peu convaincants<sup>229–231</sup>. Plusieurs hypothèses ont été émises pour justifier le manque d'efficacité de ces fibrates sur le développement de la MASLD. Il a été suggéré que la puissance relativement faible de ces agonistes PPARα utilisés chez l'homme peut également être affectée par le fait que l'expression du PPARα hépatique diminue avec les stades de progression de la MASLD<sup>232</sup>. Ainsi, les nouveaux agonistes PPARα plus puissants et plus sélectifs pourraient se montrer plus efficaces dans le traitement de la MASLD. Par exemple, comme déjà mentionné précédemment, le pemafibrate a montré dans plusieurs études cliniques qu'il pouvait être un nouvel agent prometteur dans le traitement de la MASLD en améliorant des marqueurs de l'inflammation et de la fibrose hépatique, seul<sup>117–129</sup> ou en combinaison avec d'autres agents comme les inhibiteurs SGLT-2<sup>131</sup> ou les agonistes du GLP-1R<sup>130</sup>. Une autre stratégie utilisée pour potentialiser l'effet de PPAR est l'utilisation de double agoniste. Par exemple, le saroglitazar, un double agoniste PPARα/γ, a été approuvé et est actuellement utilisé dans la prise en charge de la MASLD en Inde<sup>111</sup>. Il est également en cours d'évaluation clinique aux États-Unis et a déjà montré son efficacité chez des patients avec

MASLD seul<sup>110,112-116</sup>. Pour finir, le pan-agoniste PPAR lanifibranor (agoniste des trois isoformes de PPAR) améliore de manière dose-dépendante la MASH ainsi que la fibrose chez des patients diabétiques MASH<sup>109</sup>.

## X. PPAR $\alpha$ et athérosclérose

### A. *Activités biologiques de PPAR $\alpha$ dans l'athérosclérose*

PPAR $\alpha$  est exprimé au niveau de la paroi vasculaire dans de nombreux types cellulaires comme les monocytes/macrophages, les CML ou les cellules endothéliales où il contrôle l'expression de gènes impliqués dans les processus liés au développement des lésions d'athérosclérose. Les effets athéroprotecteurs des fibrates ont d'ailleurs été confirmés dans de nombreux modèles pré-cliniques<sup>191,192,233-238</sup>.

Dans un premier temps, comme déjà évoqué plus haut, PPAR $\alpha$  peut diminuer la production hépatique de VLDL, mais également augmenter l'expression du VLDLr au niveau du foie hépatique ce qui augmente la clairance des VLDL circulants. De plus, il a été montré que l'activation de PPAR $\alpha$  augmente l'expression de la LPL et réduit l'expression de l'ApoCIII, un de ses inhibiteurs, contribuant à la lipolyse des lipoprotéines riches en TG et à l'amélioration du profil lipidique plasmatique.

Au niveau des cellules endothéliales, PPAR $\alpha$  permet de réguler la chémoattraction et l'adhésion des molécules aux cellules endothéliales. En effet, PPAR $\alpha$ , via l'inhibition des voies de signalisation impliquées dans l'inflammation (AP-1, NF- $\kappa$ B), peut diminuer, dans les cellules endothéliales, l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 qui jouent toutes deux un rôle dans le recrutement des leucocytes et des monocytes. Il peut également diminuer l'expression et la sécrétion de l'endothéline-1, un peptide vasoconstricteur qui induit la prolifération des CML. Il semblerait également que PPAR $\alpha$  diminue l'expression de MCP-1 mais ces résultats sont un peu plus controversés. Par ces mécanismes, PPAR $\alpha$  peut réduire l'activation des cellules endothéliales. Il est également connu que PPAR $\alpha$  augmente l'efflux de cholestérol des macrophages, via une augmentation de l'expression de SR-B1 et d'ABCA1 au niveau des macrophages<sup>239-241</sup>. Cette effet a été confirmé plus récemment dans le modèle *ApoE2KI* où le pemafibrate favorise l'efflux de cholestérol des macrophages vers les HDL<sup>192</sup>. De plus, l'activation pharmacologique de PPAR $\alpha$  augmente l'expression de l'apoAI et l'apoAII, les deux apolipoprotéines majeures des HDL, ce qui contribue à l'augmentation des concentrations de HDL-C chez l'Homme. En parallèle, PPAR $\alpha$  induit l'expression de la PLTP qui

permet de transférer des phospholipides depuis les non-HDL-C vers les HDL-C. De plus, l'activation de PPAR $\alpha$  permet de réduire l'expression de cytokines pro-inflammatoires via les voies de signalisation AP-1 et NF- $\kappa$ B telles que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ou COX-2 dans les macrophages, et/ou d'augmenter l'expression de cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 ce qui permet de les orienter vers un phénotype plutôt anti-inflammatoire<sup>239-241</sup>. Au niveau des macrophages, les agonistes PPAR $\alpha$  stimulent l'activité de la NADPH oxydase et favorisent la production de ROS et de LpOx, qui deviennent des activateurs endogènes de PPAR $\alpha$  et répriment la production de marqueurs inflammatoires<sup>242</sup>. PPAR $\alpha$  exerce également ses effets anti-inflammatoires dans les autres types cellulaires impliqués dans la progression de la plaque d'athérosclérose. Par exemple, dans les CML, PPAR $\alpha$  inhibe l'expression d'IL-6, COX-2 et de TGF- $\beta$ <sup>241,243</sup>. De plus, l'activation de PPAR $\alpha$  inhibe la prolifération des CML en contrôlant directement la progression du cycle cellulaire impliqué dans la croissance des CML<sup>244</sup>. PPAR $\alpha$  est également exprimé dans les lymphocytes T où son activation inhibe l'expression de l'IL-2, du TNF- $\alpha$  et la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  impliqués dans l'inflammation<sup>245,246</sup>.

Enfin, l'activation de PPAR $\alpha$  dans les macrophages peut avoir un impact sur les processus impliqués dans l'athéromatose qui succède à la rupture de la plaque. En effet, des études ont montré que l'expression du platelet-activating factor receptor et du facteur tissulaire dans les monocytes et les macrophages humains est diminuée par l'activation de PPAR $\alpha$  ce qui pourrait réduire la thrombogénicité des lésions d'athérosclérose<sup>239,247,248</sup>. En complément de cette activité thrombogène, PPAR $\alpha$  peut également réguler la production du *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1)<sup>249-251</sup> dont les concentrations sont associées à un risque de thrombose, et du fibrinogène qui est un facteur pro-coagulant synthétisé au cours de l'inflammation<sup>251,252</sup>.

### **B. Fibrates et MCV chez l'Homme**

Comme mentionné précédemment, en raison de leur effet bénéfique sur la mortalité totale, les statines constituent le traitement de référence pour diminuer le risque de MCV. Grâce à leur effet bénéfique sur la dyslipidémie (diminution des TG et augmentation du HDL-C), les agonistes de PPAR $\alpha$ , utilisés surtout en combinaison avec une statine, représentent un intérêt thérapeutique dans le management du risque résiduel de MCV. Cependant, l'effet des fibrates sur le métabolisme des LDL est faible et une diminution du LDL-C est observée

seulement chez certains patients traités avec des fibrates. Les études cliniques étudiant l'effet des fibrates sur le risque cardiovasculaire sont résumées dans le **tableau 8**.

La première étude clinique utilisant un fibrate pour réduire le risque de survenue de MCV remonte à 1987. Les résultats de l'essai clinique **Helsinki Heart Study (HHS)** ont montré que l'administration de 600mg de **gemfibrozil** deux fois par jour a entraîné une augmentation marquée du HDL-C et une réduction des concentrations plasmatiques de cholestérol, de LDL-C, non-HDL-C et de TG ainsi qu'une réduction de 34,0 % de l'incidence des maladies coronariennes comparé au placebo chez 4081 hommes asymptomatiques présentant une dyslipidémie sans MCV<sup>253</sup>. Il est intéressant de noter que cette étude survient 7 ans avant l'étude Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) qui a été la première étude clinique testant une statine sur le risque de MCV<sup>254</sup>. Les effets du **gemfibrozil** ont été confirmés par la suite dans l'étude **Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial (VA-HIT)** en 1999<sup>255</sup>. Dans cette étude, l'effet de 1200 mg par jour de gemfibrozil a été testé chez 2531 hommes avec des antécédents de maladie coronarienne, dont la principale anomalie lipidique était un faible taux de HDL-C. Le traitement par gemfibrozil a entraîné une réduction significative du risque d'événements cardiovasculaires majeurs chez ces patients en augmentant les taux de HDL-C et en diminuant ceux de TG sans diminuer les taux de LDL-C<sup>255</sup>. Quelques années plus tard le **bézafibrate** a été testé dans l'étude **Bezafibrate Infarction Prevention (BIP)** chez 3090 patients ayant déjà subi un infarctus du myocarde ou souffrant d'angine de poitrine stable, présentant un taux de CT compris entre 180 et 250 mg/dL, un taux de HDL-C  $\leq$  45 mg/dL, un taux de TG  $\leq$  300 mg/dL et un taux de LDL-C  $\leq$  180 mg/dL<sup>256</sup>. L'administration de 400 mg de bézafibrate par jour a augmenté les HDL-C de 18 % et a réduit les TG de 21 %. Cependant, malgré une tendance à la réduction de l'incidence des critères d'évaluation primaires (infarctus du myocarde fatal ou non fatal ou mort subite), le bézafibrate n'a pas conduit à une réduction significative de ces critères. Par contre, une analyse post-hoc a montré que le bézafibrate réduisait ce critère principal chez les patients présentant un taux de TG élevé au départ ( $\geq$  200 mg/dL). En 2002, les résultats de l'étude **Lower Extremity Arterial Disease Event Reduction (LEADER)** ont confirmé les effets neutres observés précédemment avec le **bézafibrate**, puisqu'il n'a montré aucun effet sur l'incidence des maladies coronariennes et des accidents vasculaires cérébraux chez les patients de cette étude<sup>257</sup>.

En 2005, les résultats de l'étude **Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD)** sont publiés<sup>258</sup>. C'est la première étude testant le **fénofibrate** sur le risque de MCV et la première étude sur les fibrates portant exclusivement sur les patients atteints de DT2. Au début de l'étude, 9795 participants âgés de 50 à 75 ans, atteints de DT2 et ne prenant pas de statine, ont été inclus. Le critère d'évaluation principal était le décès par maladie coronarienne ou l'infarctus du myocarde non fatal. Dans cette étude, l'administration de 200 mg de fénofibrate par jour n'a pas réduit de manière significative le critère principal de risque d'événements coronariens. En revanche, le fénofibrate a réduit le nombre total d'événements cardiovasculaires, principalement en raison d'une diminution du nombre d'infarctus du myocarde non mortels et de revascularisations. À la fin de l'étude, il a été suggéré que les effets du fénofibrate pouvaient avoir été masqués par un nombre plus important d'individus commençant un traitement par statine dans le groupe placebo (presque le double par rapport aux patients recevant le fénofibrate).

En 2010, l'étude **Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD)** avait pour but de démontrer les avantages de l'utilisation du **fénofibrate en association avec une statine** chez les patients atteints de DT2<sup>259</sup>. Au début de l'étude, 5518 patients atteints de DT2 et traités par simvastatine ont reçu soit 160 mg de fénofibrate par jour, soit le placebo. L'association du fénofibrate et de la simvastatine n'a pas réduit le taux d'événements cardiovasculaires mortels, d'infarctus du myocarde non mortels ou d'accidents vasculaires cérébraux non mortels, par rapport à la simvastatine seule. Par contre, les analyses post-hoc de sous-groupes ont révélé une hétérogénéité de l'effet du traitement en fonction du sexe, avec un bénéfice pour les hommes, et surtout, comme précédemment observé avec le bésafibrate dans l'étude BIP, un bénéfice pour les patients présentant à la fois un taux basal élevé de TG ( $\geq 204$  mg/dL) et un faible taux basal de HDL-C ( $\leq 34$  mg/dL).

En 2017, une observation post-trial de l'essai ACCORD, l'étude **ACCORD Follow-On (ACCORDION)**, a été publiée, confirmant les effets initialement observés du fénofibrate en combinaison avec une statine<sup>260</sup>, notamment les effets bénéfiques dans le groupe de patients présentant une dyslipidémie athérogène (concentration élevée de TG et taux faible de HDL-C). Les résultats de ces études soutiennent l'intérêt de l'utilisation des fibrates dans la prise en charge du risque de MCV et montrent la nécessité de mettre en place des essais cliniques bien conçus notamment chez des sujets présentant une dyslipidémie athérogène.

C'est pourquoi en 2017, l'étude **Pemafibrate to Reduce Cardiovascular Outcomes by Reducing Triglycerides in Patients With Diabetes (PROMINENT)** est lancée afin de tester l'efficacité du **pemafibrate** sur le risque cardiovasculaire résiduel après un traitement par statine visant à réduire les LDL-C chez les personnes souffrant de dyslipidémie liée au DT2<sup>261</sup>. 10497 patients atteints de DT2, d'hypertriglycéridémie légère à modérée (taux de TG compris entre 200 et 499 mg par décilitre) et d'un taux de HDL-C  $\leq$ 40 mg/dL ont reçu du pemafibrate (comprimés de 0,2 mg deux fois par jour) ou le placebo correspondant. Les patients éligibles devaient recevoir un traitement hypolipémiant ou, s'ils ne pouvaient pas recevoir de statine sans effets indésirables, devaient présenter un taux de LDL-C  $\leq$ 100 mg/dL. Le principal critère d'évaluation de l'efficacité était une combinaison d'infarctus du myocarde non fatal, d'accident vasculaire cérébral ischémique, de revascularisation coronarienne ou de décès d'origine cardiovasculaire. Malheureusement, l'étude a été interrompue sur la base des résultats obtenus lors de l'analyse intermédiaire pour manque d'efficacité. En effet, les résultats de cette étude publiés en 2022, ont montré que, chez les patients atteints de DT2 avec une hypertriglycéridémie, même si le pemafibrate réduit les taux de TG, de VLDL-C, de cholestérol résiduel et d'apolipoprotéine C-III, il ne diminue pas l'incidence des événements cardiovasculaires comparés aux individus ayant reçu le placebo<sup>262</sup>. Les résultats négatifs de l'étude PROMINENT semblent remettre en question l'intérêt de l'utilisation des fibrates pour prendre en charge le risque résiduel de MCV.

Nom de l'étude	Type d'étude	Type de population	Nombre de patients	Traitement utilisé	Résultats	Remarques
HHS (1987)	RCT	Dyslipidémie	4081	600mg gemfibrozil 2 fois/jour	Réduction de 34%	↓ TG (35%) ↓ LDL-C (11%) ↑ HDL-C (11%)
VA-HIT (1999)	RCT	Maladies coronariennes	2531	1200mg gemfibrozil /jour	Réduction de 22%	↓ TG (31%) ↑ HDL-C (6%) ↓ apoB = apoAI, ↑apoAII
BIP (2000)	RCT	Maladies coronariennes	3090	400mg bézafibrate /jour	Réduction de 9.4% (non significative)	↓ TG (21%) ↑ HDL-C (18%) Dans sous-groupe de patients (HDL-C <35 mg/dL, TG ≥200 mg/dL) : réduction de 41,8%
LEADER (2002)	RCT	Pression diastolique faible	1568	400mg bézafibrate /jour	Réduction de 4% (non significative)	Réduction de 40% des maladies coronariennes non mortelles
FIELD (2005)	RCT	DT2	9795	200mg fénofibrate /jour	Réduction de 11% (non significative)	Réduction de 24 % des infarctus non mortels
ACCORD (2010)	RCT	DT2	5518	Simvastatine + 160mg fénofibrate /jour	Réduction de 8% (non significative)	Dans un sous-groupe de patients (HDL-C ≤34 mg/dL, TG ≥204 mg/dL), réduction de 28.6%
ACCORDION (2017)	Suivi après l'essai	DT2	4644	Simvastatine + 160mg fénofibrate /jour	Réduction de 7% (non significative)	Dans un sous-groupe de patients (HDL-C ≤34 mg/dL, TG ≥204 mg/dL), réduction de 27%
PROMINENT (2022)	RCT	DT2 avec dyslipidémie	10497	0.2mg pemafibrate 2x/jour	Pas de réduction	↓ TG(26,2%) ↓ VLDL-C(25,8%) ↓ Remnant-C(25,6%) ↓ apoCIII(27,6%) ↓apoB(4,8%)

**Tableau 8 : Principaux essais cliniques des fibrates sur le risque cardiovasculaire**



**OBJECTIFS DES TRAVAUX**



- Dans un premier temps, le **1<sup>er</sup> objectif de ma thèse** a été de **mieux comprendre l'implication des fibrates et le rôle du foie dans le développement de l'athérosclérose**. En effet, les fibrates ont déjà montré un effet athéroprotecteur dans de nombreux modèles précliniques murins<sup>191,192,233-237</sup>. Cependant, l'étude clinique PROMINENT a récemment montré que le pemafibrate, un agoniste puissant et sélectif de PPAR $\alpha$ , ne diminue pas le risque de MCV chez des patients diabétiques<sup>262</sup>. Pour expliquer cette différence, nous avons cherché à évaluer si le foie est impliqué dans l'athéroprotection induite par les fibrates chez la souris et nous avons évalué l'importance des propriétés anti-inflammatoires vs hypolipémiantes du PPAR $\alpha$  hépatocytaire dans cette athéroprotection.

Pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser le modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup> car il s'agit de l'un des modèles de souris les plus couramment utilisés pour étudier l'athérosclérose. Ce modèle de souris est connu comme un modèle d'hypercholestérolémie familiale associée à une hypertriglycéridémie, et est capable de développer des lésions d'athérosclérose complexes sous régime western et à court terme<sup>183</sup>. En outre, il a déjà été montré que les agonistes PPAR $\alpha$  diminuent la surface des lésions d'athérosclérose dans ce modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup><sup>234,235,237</sup>. Au laboratoire, nous avons créé un modèle de souris doublement déficientes, à la fois en LDLr et en PPAR $\alpha$  (*Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>), que nous avons utilisé dans cette étude. Pour activer PPAR $\alpha$ , nous avons fait le choix d'utiliser le pemafibrate, un nouvel agoniste plus spécifique et plus puissant que le fenofibrate classiquement utilisé<sup>200,201</sup>. Pour évaluer l'importance du foie, nous avons choisi d'utiliser une restauration de PPAR $\alpha$  uniquement dans les hépatocytes de souris grâce à l'utilisation de vecteurs adeno-associated virus (AAV) adaptés.

Les objectifs de ce 1<sup>er</sup> projet ont été les suivants :

1) Est-ce que le pemafibrate protège du développement de l'athérosclérose dans le modèle de souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> de manière PPAR $\alpha$ -dépendante ?

→ Pour cela, des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> et *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> ont été soumises à un régime western, supplémenté ou non par le pemafibrate à une dose de 0,3 mg/kg de poids corporel (0,3 mpk), pendant 8 semaines, afin d'évaluer l'effet du pemafibrate sur le développement de l'athérosclérose.

2) Est-ce que les effets athéroprotecteurs du pemafibrate sont dépendants du foie ?

→ Pour cela, nous avons utilisé uniquement des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> et nous avons restauré la protéine PPARα dans le foie des souris par la technique AAV : les souris ont été injectées par voie intraveineuse avec un AAV de sérotype 8 associé au promoteur thyroxin binding globuling (TBG), ce qui permet de restaurer spécifiquement le PPARα<sup>WT</sup> dans les hépatocytes du foie. Ces souris ont été challengées avec le même régime western supplémenté ou non avec le pemafibrate à la même dose de 0,3 mpk, pendant 8 semaines, afin d'évaluer les conséquences de l'activation spécifique du PPARα hépatocytaire par le pemafibrate sur le développement de l'athérosclérose.

3) Quelle est la contribution des propriétés anti-inflammatoires vs hypolipémiantes du PPARα hépatocytaire dans l'athéroprotection induite par le pemafibrate ?

→ Pour cela, en parallèle du PPARα<sup>WT</sup>, les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> ont également été injectées avec un mutant de PPARα, le PPARα<sup>DISS</sup> qui possède seulement l'activité de transrépression de PPARα. En effet ce mutant, développé au laboratoire, possède une mutation dans le second doigt de zinc situé dans le DBD ce qui ne lui permet pas de se fixer à l'ADN et d'exercer l'activité de transactivation de PPARα. Le PPARα<sup>DISS</sup> exerce donc seulement l'activité de transrépression de PPARα et ses propriétés anti-inflammatoires<sup>179</sup>.

- Dans un second temps, le 2<sup>ème</sup> objectif de ma thèse a été de **développer un nouveau modèle murin associant à la fois un développement progressif de MASLD et d'athérosclérose dans un contexte cardiométabolique** mimant la pathologie humaine. En effet, chez l'Homme, plusieurs preuves suggèrent que la MASH pourrait être un facteur de risque indépendant d'athérosclérose<sup>19,170</sup>. Cependant, bien que certaines hypothèses aient été proposées, le lien entre les deux pathologies n'a pas encore été démontré et reste peu clair<sup>19,171</sup>. Afin de confirmer par la suite l'existence de ce lien et d'évaluer si la modulation de la MASH peut avoir un réel impact sur le développement de l'athérosclérose, nous avons besoin de développer un modèle murin pertinent de MASH et d'athérosclérose dans nos souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>. Le régime western utilisé dans mon premier projet permet d'induire et d'évaluer le développement de l'athérosclérose dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>, mais il n'induit pas de réelle MASH avec une forte inflammation, du ballooning et de la fibrose dans le foie. C'est pourquoi il était nécessaire de

développer un nouveau modèle combinant à la fois un développement progressif de MASLD et d'athérosclérose sous régime. Pour cela, nous avons testé un nouveau régime enrichi en graisses et en cholestérol (régime TD) dans des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> mâles et femelles exprimant (*Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>) ou non (*Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>) PPAR $\alpha$  afin d'aggraver le phénotype observé.

Les objectifs de mon 2<sup>ème</sup> projet ont été les suivants :

- 1) Est-ce que le régime TD est capable d'induire un développement progressif de MASLD et d'athérosclérose dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> ?
- 2) Existe-t'il un dimorphisme sexuel dans le développement de la MASLD et de l'athérosclérose dans le modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup> ?
- 3) Existe-t'il un impact de la déficience en PPAR $\alpha$  dans le développement de la MASLD et de l'athérosclérose dans le modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup> ?

➔ Pour cela, des souris mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> et *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> ont été soumises à un régime chow ou à un régime TD enrichi en graisses et en cholestérol. Les souris ont été sacrifiées à différents temps (12 et 18 semaines) afin d'étudier la cinétique d'évolution de la MASLD et de l'athérosclérose.





**MATERIELS ET METHODES**



## I. Expérimentation animale

Des souris homozygotes déficientes pour  $Ppara^{263}$  sur fond C57BL/6J ont été croisées avec des souris homozygotes  $Ldlr^{-264}$  pour générer des souris  $Ldlr^{-}$  exprimant  $Ppara$  ( $Ldlr^{-} Ppara^{+/+}$ ) ou non ( $Ldlr^{-} Ppara^{-}$ ).

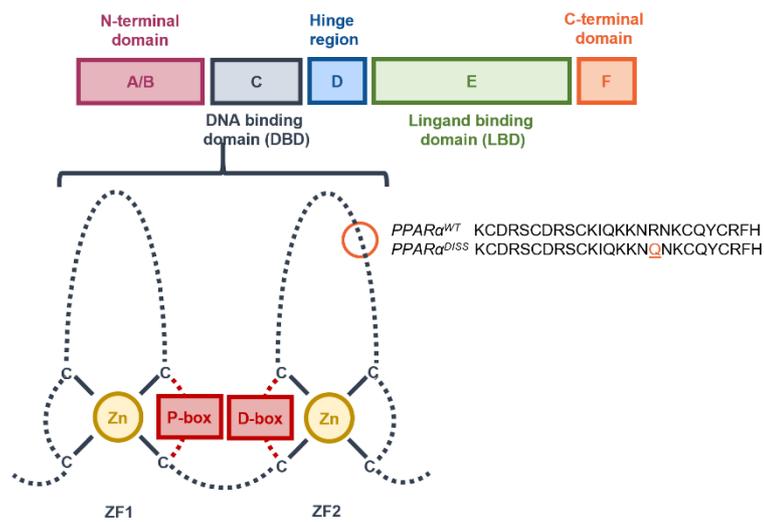
### A. *Partie 1 : L'activité anti-inflammatoire du PPAR $\alpha$ hépatocytaire est suffisante pour améliorer l'athérosclérose dans les souris $Ldlr^{-}$*

Afin de déterminer l'impact du pemafibrate sur les lésions d'athérosclérose dans nos souris  $Ldlr^{-}$ , des souris femelles âgées de 8 semaines  $Ldlr^{-} Ppara^{+/+}$  et  $Ldlr^{-} Ppara^{-}$  ont été soumises à un régime western (21,2 % de lipides, 48,5 % de glucides, 17 % de protéines) contenant 0,2 % de cholestérol (Safe, Augy, France) complété (WD+P) ou non (WD) par du pemafibrate (MedChemExpress, Suède) à une dose de 0,018g/kg de régime (presque équivalente à 0,3 mpk) pendant 8 semaines. Les souris ont été maintenues sous un cycle lumière/obscurité de 12 heures et ont eu un accès libre à l'eau.

Puis, afin d'étudier l'effet à distance du foie sur le développement de l'athérosclérose, nous avons utilisé uniquement des souris femelles  $Ldlr^{-} Ppara^{-}$ . Nous avons utilisé des AAV de sérotype 8 associés au promoteur TBG afin de restaurer spécifiquement le PPAR $\alpha$  (AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$ ) dans le foie, spécifiquement dans les hépatocytes, de nos souris  $Ldlr^{-} Ppara^{-}$ . La green fluorescent protein (GFP) (AAV8-GFP) a été utilisée comme contrôle. Les vecteurs AAV8-GFP et AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$  ont été produits par Penn Vector Core (Etats-Unis). La séquence d'ADN tagguée en 5' avec 3 motifs FLAG (3XFLAG) codant pour PPAR $\alpha$  a été insérée dans le plasmide pAAV2.1-TBG entre les sites de restriction NheI et BamHI. Les femelles  $Ldlr^{-} Ppara^{-}$  ont été injectées dans la veine de la queue avec  $6.10E11$  copies génomiques d'AAV par souris. Il s'agit d'une technique bien connue décrite dans la littérature<sup>265-267</sup> et déjà testée dans notre laboratoire<sup>179,226</sup>. 3 semaines après l'injection, les souris ont été soumises au même régime western que celui décrit ci-dessus pendant 8 semaines.

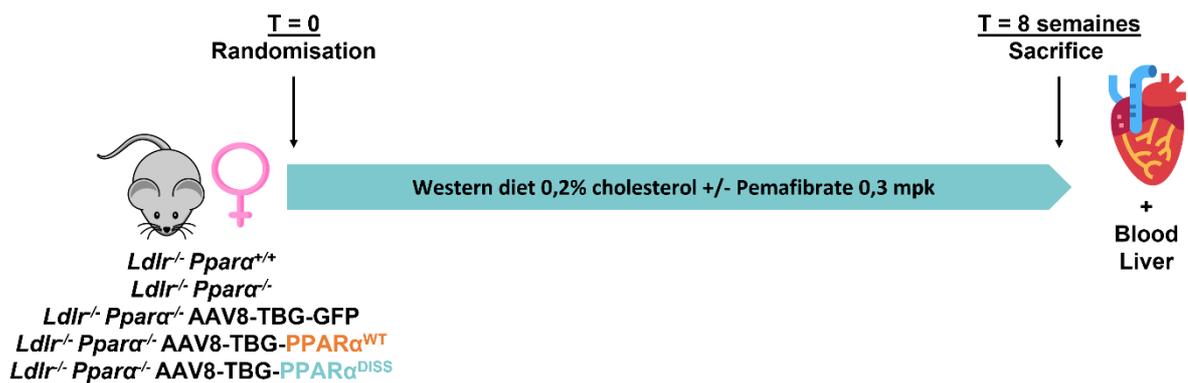
Afin d'étudier les effets anti-inflammatoires de PPAR $\alpha$  associés à son activité de transrépression indépendamment de ses effets hypolipémiants associés à son activité de transactivation, le laboratoire a développé un mutant de PPAR $\alpha$ , le PPAR $\alpha^{DISS}$ , qui ne possède que l'activité de transrépression de PPAR $\alpha$ . En effet, le PPAR $\alpha^{DISS}$  possède une mutation, arginine en position 150 mutée en glutamine (R150Q), dans le deuxième doigt de zinc du DBD (**Figure 22**). Cette mutation d'un seul acide aminé a été introduite dans la séquence d'ADN

codant pour PPAR $\alpha$  de la souris par mutagenèse dirigée à l'aide du kit QuickChange II (StrateGene, Etats-Unis). De cette manière, le PPAR $\alpha^{DIS}$  n'est pas capable de se fixer au PPRE des gènes cibles de PPAR $\alpha$  impliqués dans le contrôle du métabolisme des lipides (transactivation dépendante de la liaison à l'ADN) et il possède ainsi que l'activité de transrépression de PPAR $\alpha$  et ses effets anti-inflammatoires. En parallèle, des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> ont donc été injectées avec le PPAR $\alpha$  mutant (AAV8-PPAR $\alpha^{DIS}$ ) afin de restaurer seulement l'activité de transrépression de PPAR $\alpha$  dans les hépatocytes. De la même manière, 3 semaines après l'injection, ces souris ont été soumises au régime western décrit précédemment pendant 8 semaines.



**Figure 22 :** Position (indiquée par le cercle orange) et séquence de la mutation R150Q introduite dans la séquence PPAR $\alpha$  pour obtenir le mutant PPAR $\alpha^{DIS}$

A la fin du régime, le foie, le cœur et le plasma ont été collectés pour les analyses biochimiques, transcriptomiques et histologiques (**Figure 23**).



**Figure 23 :** Protocole expérimental utilisé pour déterminer les effets du foie et de l'inflammation hépatique sur le développement de l'athérosclérose dans le modèle murin *Ldlr<sup>-/-</sup>*

### B. Partie 2 : Développement d'un nouveau modèle murin pertinent de MASLD et d'athérosclérose

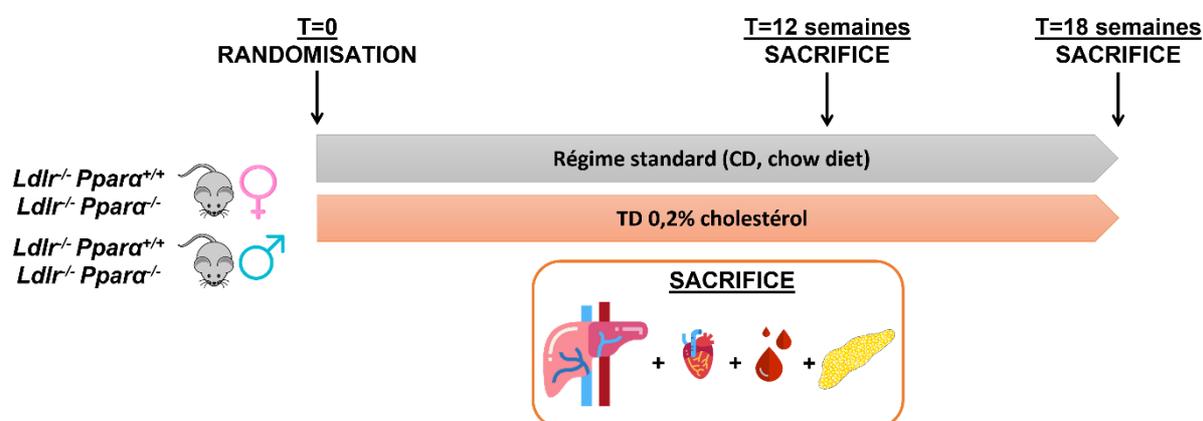
Pour la deuxième partie de ma thèse qui vise à développer un nouveau modèle pertinent de MASLD et d'athérosclérose, des souris mâles et femelles *Ldlr<sup>-/-</sup> Ppara<sup>+/+</sup>* et *Ldlr<sup>-/-</sup> Ppara<sup>-/-</sup>* ont été soumises à un régime TD dont le rapport d'AG  $\omega 3/\omega 6$  a été modifié par rapport au régime western (**Tableau 9**). En parallèle, des souris mâles et femelles *Ldlr<sup>-/-</sup> Ppara<sup>+/+</sup>* et *Ldlr<sup>-/-</sup> Ppara<sup>-/-</sup>* ont également été soumises à un régime standard (chow diet, CD). Les souris ont été pesées 1 fois par semaine. Afin d'étudier la cinétique de développement de la MASLD et de l'athérosclérose, les souris ont été sacrifiées à 12 et 18 semaines.

A la fin du régime, le foie, le cœur, le plasma ainsi que le tissu adipeux sous-cutané (subcutaneous white adipose tissue, SWAT) et péri-gonadien (perigonadian white adipose tissue, pWAT) ont été collectés et pesés pour les analyses biochimiques, transcriptomiques et histologiques (**Figure 24**).

<b>Sucres</b>	45.5%
<b>Graisses</b>	23.2%
<b>Protéines</b>	19.5%
<b>Vitamines et minéraux</b>	6.5%
<b>Céréales et fibres</b>	5%
<b>Acides aminés</b>	<1%
<b>Cholestérol</b>	0.2%
<b>Autre</b>	<1%

**Tableau 9 :** Composition centésimale du régime TD utilisé pour induire un nouveau modèle de MASH et d'athérosclérose dans le modèle murin *Ldlr<sup>-/-</sup>*

Toutes les procédures expérimentales ont été approuvées par le comité d'éthique régional des Hauts-de-France (APAFIS# 29368-2020122211352298v4).



**Figure 24 :** Protocole expérimental utilisé pour étudier la cinétique de développement de la MASLD et de l'athérosclérose dans le modèle *Ldlr<sup>-/-</sup>*

## II. Analyses biochimiques

Pour les analyses biochimiques sur le plasma, les souris ont été mises à jeun pendant 6 heures avant le prélèvement au sinus rétro-orbital sous anesthésie induite par l'isoflurane. La glycémie a été mesurée avant le sacrifice à partir d'une goutte de sang prélevée par incision à la queue avec le glucomètre Accu-Check Performa.

Les concentrations d'insuline ont été mesurées à l'aide du kit ELISA disponible dans le commerce Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA (Merckodia, Suède).

Les concentrations plasmatiques de TC, TG et HDL-C ont été mesurées par méthode enzymatique colorimétrique grâce à des kits disponibles dans le commerce (Biolabo, France). Les concentrations de non HDL-C ont été calculées en soustrayant les concentrations de HDL-C aux concentrations de TC. Les concentrations d'AG libres ainsi que l'activité des enzymes hépatiques AST et ALT ont été mesurées à l'aide de l'automate Konelab (Thermo Scientific, Etats-Unis). Les fractions de lipoprotéines ont été séparées et collectées par chromatographie liquide rapide des protéines (fast protein liquid chromatography, FPLC) sur le système Waters 2695 avec une colonne de filtration en gel Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare, Etats-Unis) et le collecteur de fraction Waters III. Les concentrations de TG et de TC ont ensuite été mesurées dans chaque fraction à l'aide des kits mentionnés précédemment.

Les concentrations plasmatiques d'IL-1 $\beta$  ont été mesurées à l'aide du kit haute sensibilité Mouse IL-1 $\beta$ /IL-1F2 High Sensitivity Quantikine<sup>®</sup> (R&D Systems, Etats-Unis).

Les concentrations plasmatiques de globules blancs totaux, de neutrophiles, de lymphocytes, de monocytes, d'éosinophiles et de basophiles ont été mesurés à l'aide de l'automate ProCyte Dx Haematology Analyser (IDEXX Laboratories, Etats-Unis).

### III. Analyses moléculaires

#### **A. Extraction d'ARN et analyse par PCR quantitative**

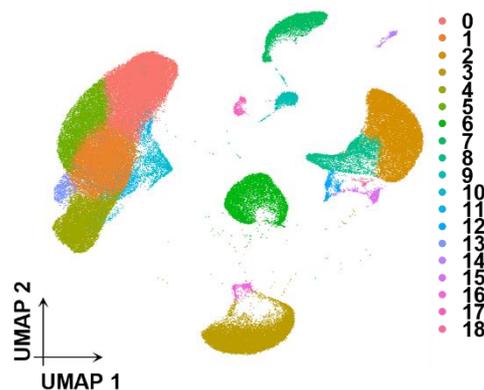
L'ARN total a été extrait des foies de souris à l'aide de TRIzol (ThermoFischer, Etats-Unis). Pour la PCR quantitative, après traitement à la DNase, des quantités égales d'ARN ont été rétrotranscrits grâce au kit haute capacité de transcription inverse d'ADNc (Applied Biosystems, USA). Les niveaux d'expression d'ARN ont été déterminés après PCR quantitative en temps réel sur le système QuantStudio<sup>TM</sup> 3 Real-Time PCR (ThermoFischer, Etats-Unis). Les niveaux d'expression des gènes d'intérêt ont été normalisés par rapport au gène de ménage cyclophiline.

#### **B. Isolation des noyaux et single nuclei-RNA sequencing (sn-RNAseq)**

Pour isoler les noyaux, les foies congelés de 3 souris sélectionnées au hasard dans chaque groupe ont été délicatement broyés avec un homogénéiseur de Dounce dans un tampon de lyse NP40 (IGEPAL<sup>®</sup> I3021, Sigma-Aldrich, Etats-Unis) puis incubés sur la glace pendant 5 minutes. Les échantillons ont ensuite été filtrés avec un tamis cellulaire de 70  $\mu$ m puis 40  $\mu$ m et centrifugés pendant 5 min à 500g à 4°C. Les culots comprenant les noyaux ont été re-suspendus dans un tampon de lavage (1% d'albumine sérique bovine, 0,2U/ $\mu$ L d'inhibiteur de RNase). Un marquage avec des hashtag oligos (HTO) a été effectué afin d'identifier les souris de chaque pool. Les culots ont ensuite été triés au fluorescence-activated cell sorting (FACS) avec le marqueur SYTOX<sup>TM</sup> AADvanced<sup>TM</sup> (ThermoFischer, Etats-Unis) afin d'éliminer les débris. Après le tri cellulaire, la qualité des noyaux a été vérifiée visuellement par coloration au bleu Trypan.

Avant l'encapsulation, les noyaux de chaque souris ont été poolés à proportion égale. L'encapsulation a été réalisée à l'aide du 10X Chromium Controller et du kit 3' GEMs v3.1. Les bibliothèques ont été séquencées en ciblant environ 25.000 lectures/noyaux. Après le contrôle qualité du séquençage, CellRanger v7.0.1 (10X Genomics, USA) a été utilisé pour aligner les

lectures sur le génome de référence de la souris (référence mm10-2020-A obtenue auprès de 10X Genomics) et générer la matrice unique molecular identifier (UMI). Le package R Seurat v.5 (Satija Lab)<sup>268</sup> a été utilisé pour l'analyse des comptages bruts. Les noyaux exprimant moins de 200 et plus de 5000 gènes ont été exclus, ainsi que les noyaux contenant plus de 5% de gènes mitochondriaux. Le contrôle qualité et le prétraitement des noyaux ont permis d'identifier 122.616 noyaux hépatiques totaux, dont 27.648 provenant du groupe AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$ , 17.370 de l'AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$ -pemafibrate, 10.575 de l'AAV8-PPAR $\alpha^{DIS}$ , 25.014 de l'AAV8-PPAR $\alpha^{DIS}$ -pemafibrate, 14.531 de l'AAV8-GFP et 27.478 de l'AAV8-GFP-pemafibrate. Le clustering des noyaux a été réalisé à l'aide des outils d'intégration Seurat et a permis d'identifier 19 clusters de noyaux à une résolution de 0,5 (Figure 25). Les gènes spécifiques de chaque cluster ont été identifiés avec la fonction FindAllMarkers avec les paramètres min.pct = 0.01, test.use = 'wilcox'. Les groupes ont été annotés en fonction des marqueurs spécifiques au type cellulaire, combinés à des marqueurs issus de la bibliographie.



**Figure 25 :** Clustering des noyaux hépatiques des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>. Représentation UMAP des clusters de noyaux dans l'ensemble des données de snRNA-seq avec les 6 groupes AAV, à une résolution de 0.5

#### IV. Analyses histologiques du foie

Des coupes de foie de 3  $\mu$ m d'épaisseur incluses en paraffine ont été colorées au H&E. La stéatose et l'inflammation ont été évaluées à un grossissement 200 selon la système de notation de Bedossa<sup>34</sup> : stéatose <5%  $\rightarrow$  0 ; 5%-33%  $\rightarrow$  1 ; 33%-66%  $\rightarrow$  2 ; >66%  $\rightarrow$  3 ; pas de foyers inflammatoires  $\rightarrow$  0 ;  $\leq$ 2 foyers  $\rightarrow$  1 ; >2 foyers  $\rightarrow$  2 ; 0  $\rightarrow$  hépatocytes normaux ; 1  $\rightarrow$  présence d'hépatocytes rond avec un cytoplasme réticulé rose pâle ; 2  $\rightarrow$  présence d'hépatocytes rond avec un cytoplasme réticulé rose pâle et un diamètre élargi (au moins deux fois la taille d'un hépatocyte normal).

Les coupes de foie ont également été colorées au rouge Sirius pour l'évaluation de la fibrose. La fibrose a été quantifiée grâce à une Macro ImageJ sur le logiciel Fiji (NIH, Etats-Unis).

Pour l'immunohistochimie du foie et l'évaluation de l'inflammation hépatique, des coupes de foie congelées (5 µm) ont été fixées dans de l'acétone froide (-20°C) et incubées pendant une nuit avec un anticorps anti-CD68 (MCA1957, dilution 1:100).

#### **V. Evaluation des lésions d'athérosclérose**

A la fin du régime, les cœurs ont été fixés dans une solution de glyoxal à 4% (pH 4-5). Des coupes congelées sériées de 10 µm d'épaisseur ont été coupées entre les pieds de valves et le sinus aortique. Les lésions d'athérosclérose ont été quantifiées après coloration à l'Oil Red O. L'immunohistochimie au niveau du sinus aortique a été réalisée avec l'anticorps MOMA-2, (MAB1852, dilution 1:400), anti-VCAM-1 (MVCAM.A, dilution 1:400) et anti- $\alpha$ -SMA (MAB1945, dilution 1:400). Les images ont été capturées et analysées avec le logiciel d'imagerie NIS-Element.

#### **VI. Extraction des protéines et analyses par Western-Blot**

Pour l'extraction des protéines, les tissus hépatiques ont été lysés avec le tampon de lyse RIPA. Les concentrations de protéines ont été déterminées à l'aide du kit de quantification des protéines BC assay (Interchim, France). Les échantillons ont été déposés et ont migré sur un gel SDS-polyacrylamide 10% par électrophorèse, puis ont été transférés sur une membrane en polyfluorure de vinylidène (PVDF). La membrane a été incubée pendant une nuit à 4°C avec un anticorps anti-PPAR $\alpha$  (ab126285, Abcam, Angleterre) et anti-HSP90 $\alpha/\beta$  (K3720A, BioLegend, Etats-Unis). Les protéines ont été révélées et quantifiées par fluorescence avec le système d'imagerie Odyssey CLx (LI-COR Biosciences, Etats-Unis) et le logiciel Image Studio™ Lite (LI-COR Biosciences, Etats-Unis). Les niveaux d'expression des protéines ont été normalisés par rapport à HSP90 utilisée comme témoin de charge.

#### **VII. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism 9 software (GraphPad, Etats-Unis). Les différences entre les groupes ont été évaluées par une analyse de

variance (ANOVA) à deux facteurs. Une valeur de  $p < 0,05$  est considérée comme statistiquement différente (indiquée par \* pour l'effet du pemaibrate et § pour l'effet du génotype dans le projet 1 ; et \* pour l'effet du régime et § pour l'effet du génotype dans le projet 2).

A decorative banner with a light blue background and a dark blue border. The banner has a ribbon-like shape with pointed ends. The word "RESULTATS" is written in the center in a bold, dark blue, sans-serif font.

**RESULTATS**



**PARTIE 1 : L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE**  
**DU PPAR $\alpha$  HEPATOCYTAIRE EST SUFFISANTE**  
**POUR AMELIORER L'ATHEROSCLEROSE DANS LES SOURIS *Ldlr*<sup>-/-</sup>**

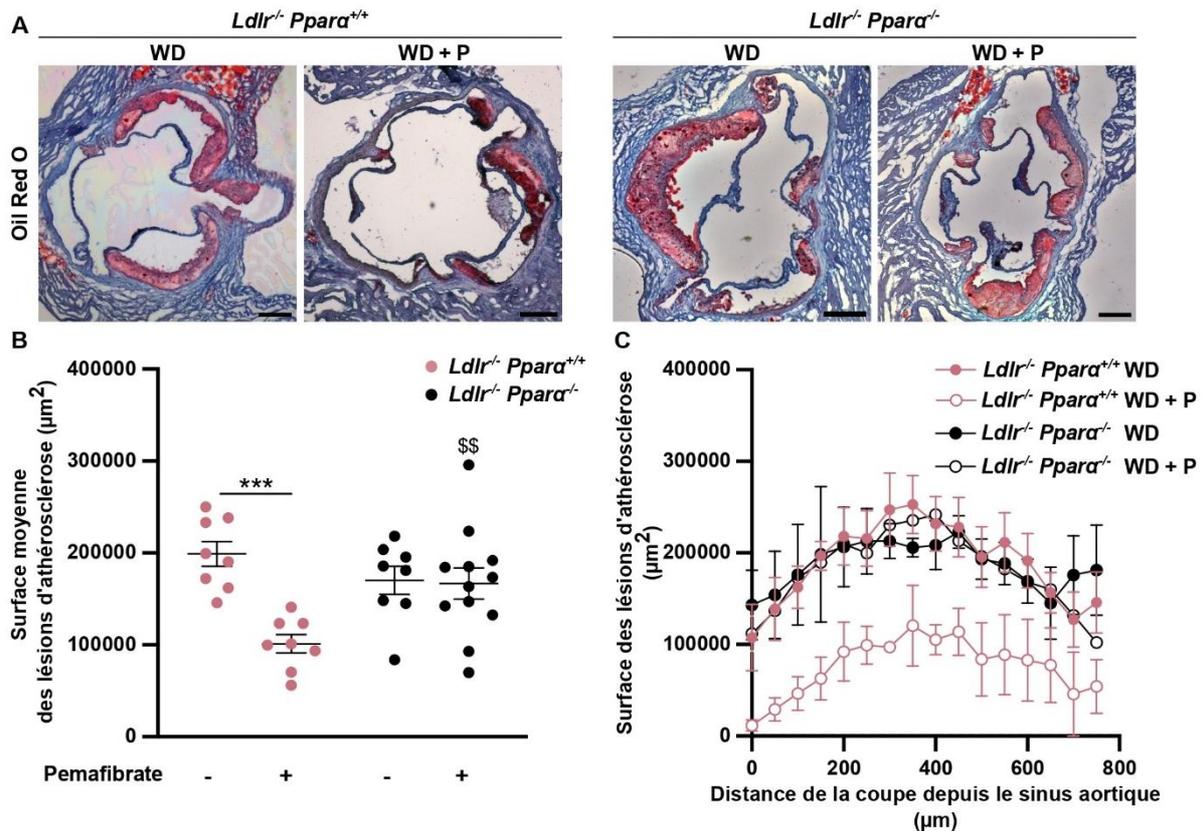
Le but de ce 1<sup>er</sup> projet a été de déterminer les mécanismes impliqués dans l'athéroprotection induite par les fibrates, agonistes de PPAR $\alpha$ , chez la souris, et particulièrement d'étudier l'importance du foie dans ses effets athéroprotecteurs.

De manière intéressante, nous avons évalué l'importance d'une activation sélective du PPAR $\alpha$  hépatocytaire par le pemafibrate sur le développement de l'athérosclérose dans le modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup> et étudié le rôle des effets anti-inflammatoires (transrépression) par rapport à l'action hypolipémiante (transactivation).

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un article soumis à la revue *Science Translational Medicine* et actuellement en révision favorable (**Annexe 1**).

**I. Le pemafibrate diminue les lésions d'athérosclérose dans le modèle murin *Ldlr*<sup>-/-</sup> de manière PPAR $\alpha$  dépendante**

Des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> et *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> ont été soumises à un régime western supplémenté (WD+P) ou non (WD) avec le pemafibrate (0.0018mg/kg de régime) pendant 8 semaines. A la fin des 8 semaines, les analyses histologiques sur les coupes de coeur colorées à l'Oil Red O et contrecolorées à l'H&E ne montrent aucune différence de surface de lésions d'athérosclérose au niveau du sinus aortique entre les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> et *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> (**Figure 26**). Par contre, le pemafibrate diminue la surface des lésions d'athérosclérose de 50% dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mais pas dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>. Ces résultats indiquent que le pemafibrate exerce des effets athéroprotecteurs dépendants de PPAR $\alpha$  dans le modèle murin *Ldlr*<sup>-/-</sup>.



**Figure 26 : Le pemaifibrate diminue la surface des lésions d'athérosclérose de manière PPARα dépendante dans le modèle murin *Ldlr<sup>-/-</sup>*.** (A) Représentation histologique du sinus aortique coloré à l'Oil Red O et contre-coloré à l'H&E. Grossissement x40. Bar d'échelle 100 µm (B) Quantification de la surface moyenne des lésions d'athérosclérose en µm<sup>2</sup> des pieds de la valve aortique jusqu'au ventricule. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. (C) Quantification des surfaces de lésions d'athérosclérose tout au long du sinus aortique. Chaque point représente la surface moyenne de la lésion (± SEM) déterminée à une distance spécifique du sinus aortique. Les souris ont été soumises à un régime western supplémenté (+) ou non (-) avec le pemaifibrate. WD=régime western ; WD+P=régime western + pemaifibrate. \*effet du pemaifibrate ; §effet génotype. §§p<0.01 ; \*\*\*p<0.001.

Par ailleurs, il a été décrit que les cellules sanguines et principalement les globules blancs peuvent jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose<sup>269</sup>. Nous avons donc mesuré les concentrations plasmatiques de leucocytes dans les souris *Ldlr<sup>-/-</sup> Ppara<sup>+/+</sup>* et *Ldlr<sup>-/-</sup> Ppara<sup>-/-</sup>* à la fin des 8 semaines de régime. Aucune différence n'est observée sur le nombre de globules blancs plasmatiques, y compris les monocytes, dans les souris *Ldlr<sup>-/-</sup>* (Tableau 10). Ces résultats signifient que le nombre de globules blancs plasmatiques ne contribue pas aux effets athéroprotecteurs du pemaifibrate dans le modèle murin *Ldlr<sup>-/-</sup>*.

Pema <span>fibr</span> ate	<i>Ldlr</i> <sup>-/-</sup> <i>Ppara</i> <sup>+/+</sup>		<i>Ldlr</i> <sup>-/-</sup> <i>Ppara</i> <sup>-/-</sup>		ANOVA		
	-	+	-	+	Effet génotype	Effet pema <span>fibr</span> ate	Effet génotype x pema <span>fibr</span> ate
Globules blancs (x10 <sup>6</sup> /μL)	7.18 ± 0.60	8.30 ± 0.57	7.73 ± 0.49	7.10 ± 0.40	0.54	0.64	0.10
Neutrophiles (x10 <sup>6</sup> /μL)	1.22 ± 0.12	1.10 ± 0.18	1.20 ± 0.11	1.18 ± 0.15	0.81	0.64	0.75
Lymphocytes (x10 <sup>6</sup> /μL)	5.21 ± 0.51	6.32 ± 0.45	5.78 ± 0.45	5.31 ± 0.34	0.62	0.48	0.08
Monocytes (x10 <sup>6</sup> /μL)	0.53 ± 0.04	0.61 ± 0.10	0.53 ± 0.05	0.42 ± 0.03	0.13	0.76	0.12
Eosinophiles (x10 <sup>6</sup> /μL)	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.48	0.91	0.56
Basophiles (x10 <sup>6</sup> /μL)	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.09	0.48	0.38

**Tableau 10 :** Le pemafibrate ne modifie le nombre de cellules immunes plasmatiques dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>. Concentrations plasmatiques des globules blancs totaux, des neutrophiles, des lymphocytes, des monocytes, des éosinophiles et des basophiles mesurées à la fin du régime dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> and *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>. Les résultats sont présentés en moyenne ± SEM.

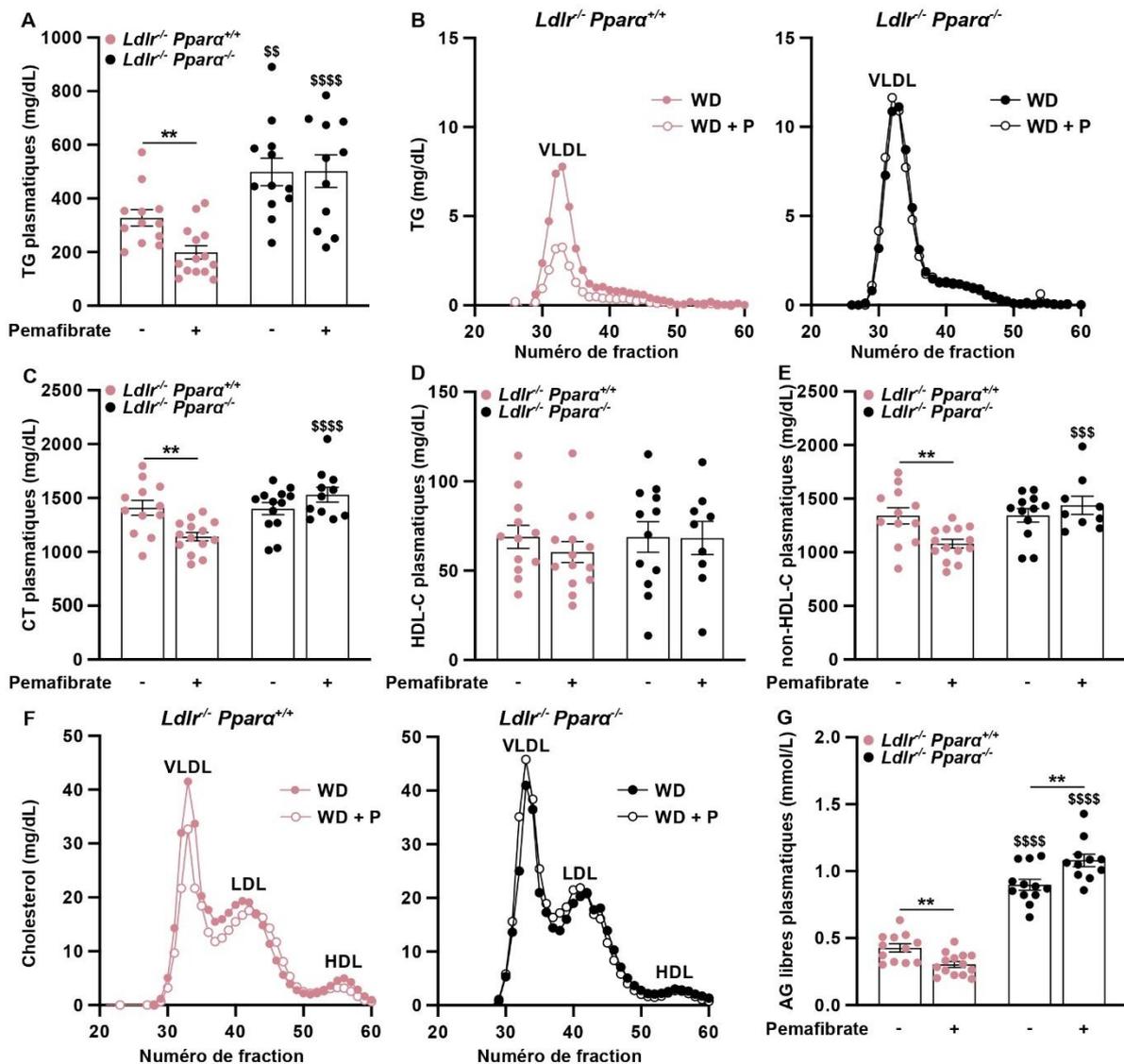
## II. Le pemafibrate améliore le profil lipidique athérogène dans le modèle murin *Ldlr*<sup>-/-</sup> de manière PPARα dépendante.

Les concentrations plasmatiques de lipides (TG et CT) et d'AG libres ont été mesurées à la fin des 8 semaines de régime (**Figure 27**). Comme attendu, les concentrations plasmatiques de TG sont plus importantes dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> comparées au souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> (**Figure 27A**). Le pemafibrate diminue les concentrations plasmatiques de TG dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mais pas dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>. Les profils lipidiques plasmatiques établis par FPLC révèlent que cette diminution des TG par le pemafibrate est associée à la fraction VLDL (**Figure 27B**).

Par ailleurs, les concentrations plasmatiques de CT sont similaires entre les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> et *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> (**Figure 27C**). De la même manière que les TG, le pemafibrate diminue les concentrations plasmatiques de CT dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mais pas dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> et cette diminution est majoritairement liée à la fraction non-HDL (**Figure 27D,E**). Les profils lipidiques plasmatiques montrent une diminution du CT associée à la fraction VLDL dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> traitées avec le pemafibrate (**Figure 27F**).

Enfin, les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> présentent des concentrations plasmatiques d'AG libres plus importantes que les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> (**Figure 27G**). Le pemafibrate diminue les

concentrations plasmatiques d'AG libres dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mais pas dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>. Ces résultats montrent que le pemafibrate améliore le profil lipidique athérogène dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> de manière PPARα dépendante.

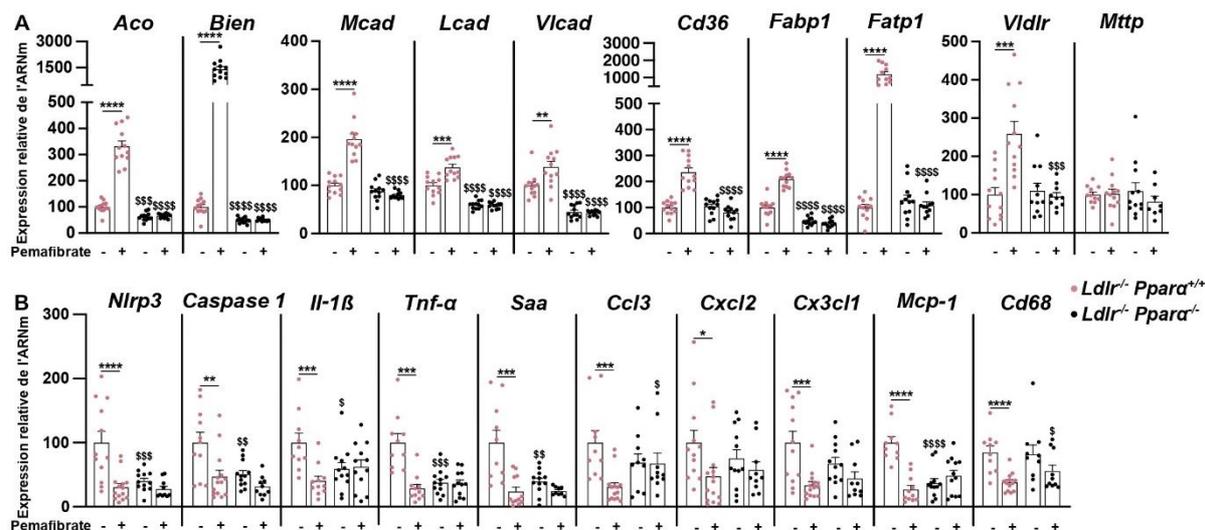


**Figure 27 : Le pemafibrate améliore la dyslipidémie athérogène dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> de manière PPARα dépendante.** (A) Concentrations plasmatiques de TG. (B) Profil lipidique plasmatique des TG déterminé par FPLC dans les plasmas poolés des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> et *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>. Concentrations plasmatiques de (C) CT, (D) HDL-C et (E) non-HDL-C. (F) Profil lipidique plasmatique du cholestérol déterminé par FPLC dans les plasmas poolés des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> et *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>. (G) Concentrations plasmatiques d'AG libres. Les données sont présentées en moyenne ± SEM. Les souris ont été soumises à un régime western supplémenté (+) ou non (-) avec du pemafibrate. WD=régime western ; WD+P=régime western + pemafibrate. \*effet du pemafibrate ; \$effet genotype. \*\*ou<sup>\$\$</sup>p<0.01 ; <sup>\$\$\$\$</sup>p<0.001 ; <sup>\$\$\$\$\$</sup>p<0.0001.

### III. Le pemafibrate améliore le métabolisme des lipides et l'inflammation hépatique dans le modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup> de manière PPARα dépendante.

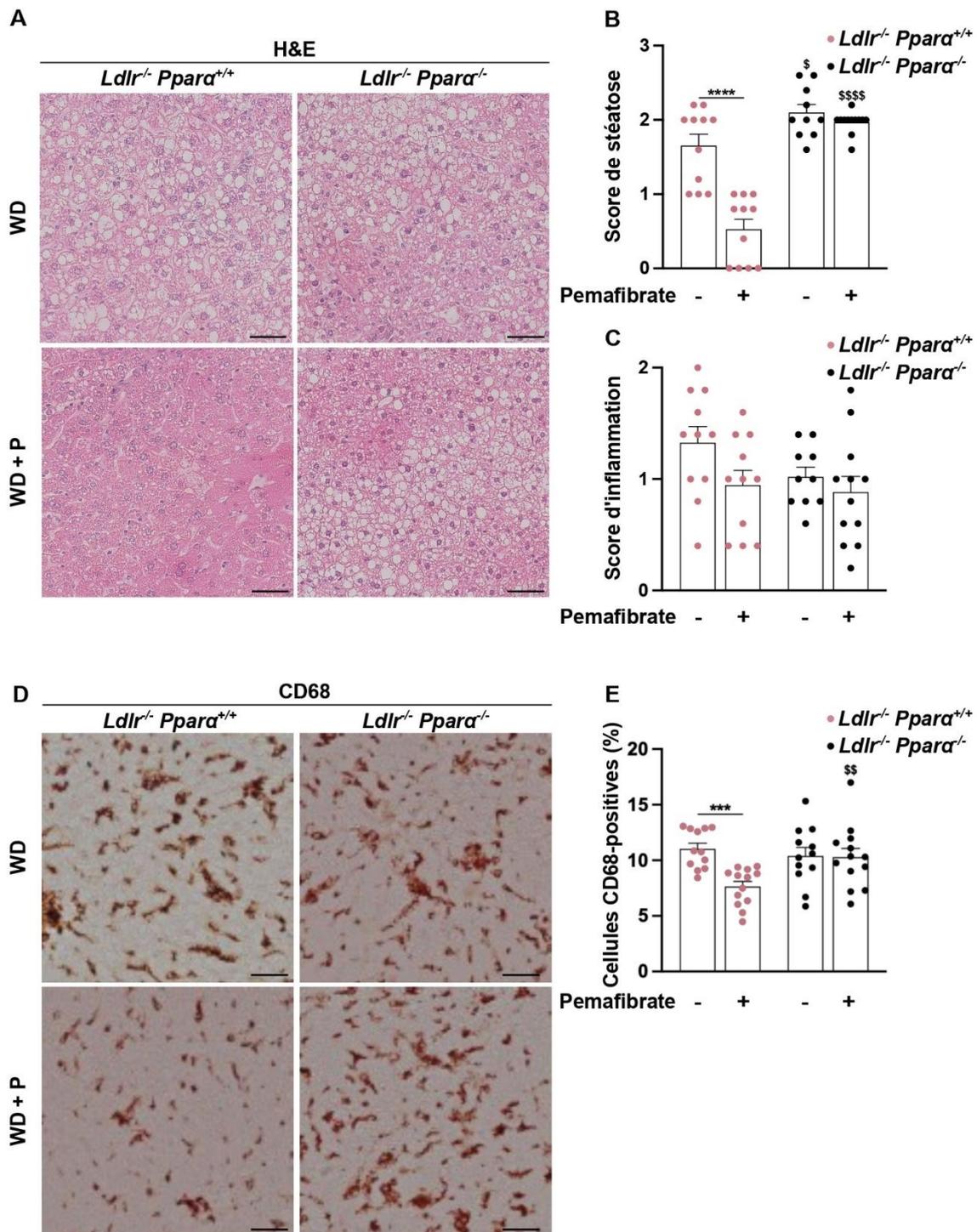
Pour évaluer si le pemafibrate induit à la fois l'activité de transactivation et de transrépression de PPARα dans le foie des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>, nous avons mesuré l'expression hépatique de gènes cibles de PPARα impliqués dans le métabolisme des lipides et liés à la transactivation (**Figure 28A**). Le pemafibrate induit l'expression de gènes liés à la β-oxydation peroxysomale (*Aco*, *Bien*), à la β-oxydation mitochondriale (*Mcad*, *Lcad*, *Vlcad*), à l'entrée des AG (*Cd36*, *Fabp1*, *Fatp1*) et à la clairance des VLDL via le VLDLr (*Vldlr*) dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mais pas dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>. Aucune différence n'est observée sur les niveaux d'expression hépatique de la *Mttp* impliquée dans la synthèse des VLDL ce qui signifie que, comme il a déjà été suggéré<sup>270</sup>, le pemafibrate améliore le métabolisme des lipides hépatiques et les taux de lipides plasmatiques via une amélioration de la clairance des VLDL et des remnants au niveau du foie dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>.

De manière surprenante, l'expression hépatique des gènes liés à l'inflammation est globalement plus importante dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> comparées au souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> (**Figure 28B**). Le pemafibrate diminue l'expression hépatique des gènes liés à l'inflammasome tels que NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (*Nlrp3*) et *caspase 1*, *Tnf-α*, *Il-1β*, *Ccl3*, C-X-C Motif Chemokine Ligand 2 (*Cxcl2*), fractalkine (*Cx3cl1*), *Mcp-1* et *Saa* dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mais pas dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>. De plus, le pemafibrate diminue l'expression hépatique de *Cd68*, un marqueur de macrophage de manière PPARα dépendante. Ces résultats indiquent une amélioration de l'inflammation hépatique par le pemafibrate de manière PPARα dépendante dans le modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup>.



**Figure 28 : Le pemafibrate améliore l'expression hépatique des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et l'inflammation de manière PPAR $\alpha$  dépendante dans le modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup>.** (A) Expression génique dans le foie de *Aco*, *Bien*, *Mcad*, *Lcad*, *Vlcad*, *Cd36*, *Fabp1*, *Fatp1*, *Vldlr* et *Mttp*, impliqués dans le métabolisme des lipides, mesurée par RT-qPCR. (B) Expression génique dans le foie de *Nlrp3*, *Caspase-1*, *Il-1 $\beta$* , *Tnf- $\alpha$* , *Saa*, *Ccl3*, *Cxcl2*, *Cx3cl1*, *Mcp-1* et *Cd68*, impliqués dans l'inflammation, mesurée par RT-qPCR. Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les souris ont été soumises à un régime western supplémenté (+) ou non (-) avec le pemafibrate. WD=régime western ; WD+P=régime western + pemafibrate. \*effet du pemafibrate ; \$effet génotype. \*ou<sup>\$</sup>p<0.05 ; \*\*ou<sup>\$\$</sup>p<0.01 ; \*\*\*ou<sup>\$\$\$</sup>p<0.001 ; \*\*\*\*ou<sup>\$\$\$\$</sup>p<0.0001.

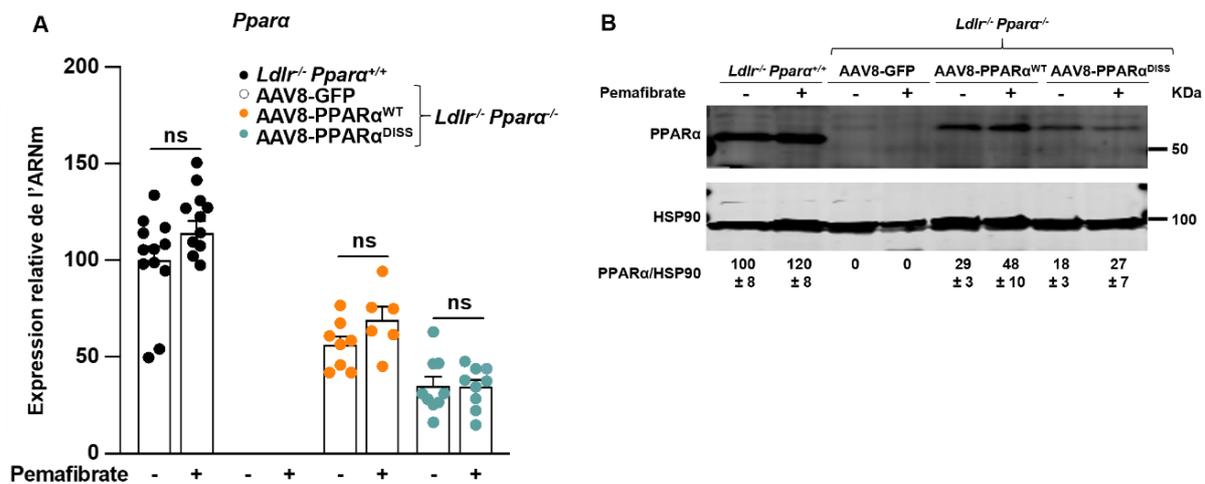
Pour confirmer l'analyse d'expression de gènes et les effets du pemafibrate sur le métabolisme des lipides et l'inflammation hépatique, des analyses histologiques au niveau du foie ont été réalisées sur des coupes colorées à l'H&E afin de déterminer le score de stéatose et d'inflammation (Figure 29). Comme déjà observé dans plusieurs modèles murins<sup>180,181,191,217</sup>, la déficience en PPAR $\alpha$  aggrave la stéatose hépatique dans le modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup> (Figure 29A,B). Le pemafibrate diminue significativement le score de stéatose et tend à diminuer le score d'inflammation dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mais pas dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> (Figure 29C). De plus, le pemafibrate diminue significativement le nombre de cellules CD68-positives dans le foie des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mais pas *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> (Figure 29D,E). Ces résultats indiquent que le pemafibrate améliore à la fois le métabolisme des lipides et l'inflammation hépatique dans le modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup> de manière PPAR $\alpha$  dépendante.



**Figure 29 : Le pema-fibrate améliore le métabolisme des lipides et l'inflammation hépatique de manière PPAR $\alpha$  dépendante dans le modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup>.** (A) Représentation histologique des coupes de foies colorées à l'H&E. Grossissement x200. Bar d'échelle 20  $\mu$ m. (B) Score de stéatose estimée sur les coupes histologiques. Stéatose <5%, 0; 5%–33%, 1; 33%–66%, 2; >66%, 3. (C) Score d'inflammation estimée sur les coupes histologiques. Pas de foyer = 0 ;  $\leq 2$ foyers = 1 ; >2 foyers = 2. (D) Représentation histologique des coupes de foies colorées avec un anticorps anti-CD68. Grossissement x200. Bar d'échelle 20  $\mu$ m. (E) Quantification dans le foie du pourcentage de cellules CD68-positives par champ. Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les souris ont été soumises à un régime western supplémenté (+) ou non (-) avec le pema-fibrate. WD=régime western ; WD+P=régime western + pema-fibrate. \*effet du pema-fibrate ;  $\$$ effet génotype.  $^{\$}p<0.05$  ;  $^{\$\$}p<0.01$  ;  $^{***}p<0.001$  ;  $^{****}$ ou  $^{ssss}p<0.0001$ .

#### IV. Le pemafibrate améliore le métabolisme lipidique et l'inflammation hépatique via le PPAR $\alpha$ hépatocytaire

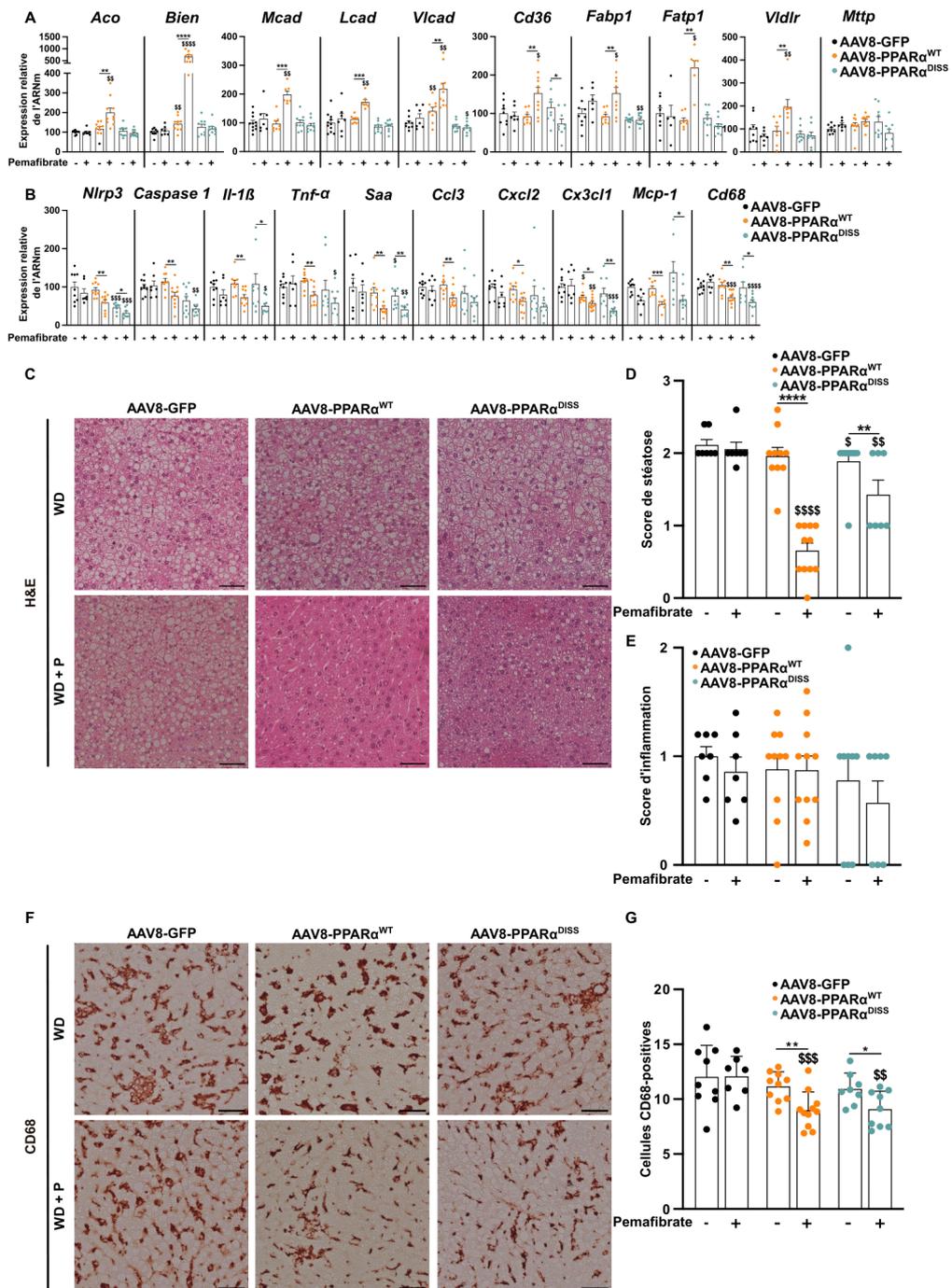
Pour évaluer le rôle du PPAR $\alpha$  hépatocytaire dans les effets métaboliques et cardiovasculaires du pemafibrate dans le modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup>, le PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> a été restauré dans le foie de souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> grâce à l'utilisation d'un AAV8 qui, via le promoteur TBG, permet d'exprimer PPAR $\alpha$  seulement dans les hépatocytes (AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>)<sup>265-267</sup>. Afin de restaurer seulement l'activité de transrépression de PPAR $\alpha$  dans les hépatocytes, des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> ont, en parallèle, été injectées avec le mutant de PPAR $\alpha$ , le PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> qui exerce seulement l'activité de transrépression de PPAR $\alpha$  (AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>)<sup>179</sup>, et avec un AAV8 codant pour la GFP utilisée comme contrôle (AAV8-GFP). 3 semaines après l'injection, les souris ont été soumises au régime western supplémenté ou non avec le pemafibrate pendant 8 semaines. A la fin du régime, PPAR $\alpha$ , au niveau génique et protéique, est clairement présent dans le foie des souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> et AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> avec ou sans pemafibrate mais cette expression est plus faible comparée aux souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> exprimant PPAR $\alpha$  dans tout leur organisme (Figure 30).



**Figure 30 : Expression hépatique de PPAR $\alpha$  dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> injectées avec un AAV8. (A) Expression génique de *Ppara* dans le foie des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> injectées avec un AAV8 comparée à l'expression des souris sauvages *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>. (B) Quantification de la protéine PPAR $\alpha$  dans les échantillons de foie des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> injectées avec un AAV8 comparée à l'expression des souris sauvages *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> (n=3 pools/condition). Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les souris ont été soumises à un régime western supplémenté (+) ou non (-) avec le pemafibrate. ns= non significatif.**

Comme attendu, le pemafibrate augmente l'expression hépatique des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> mais pas dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>, alors que l'expression hépatique des gènes liés à l'inflammation diminue à la fois

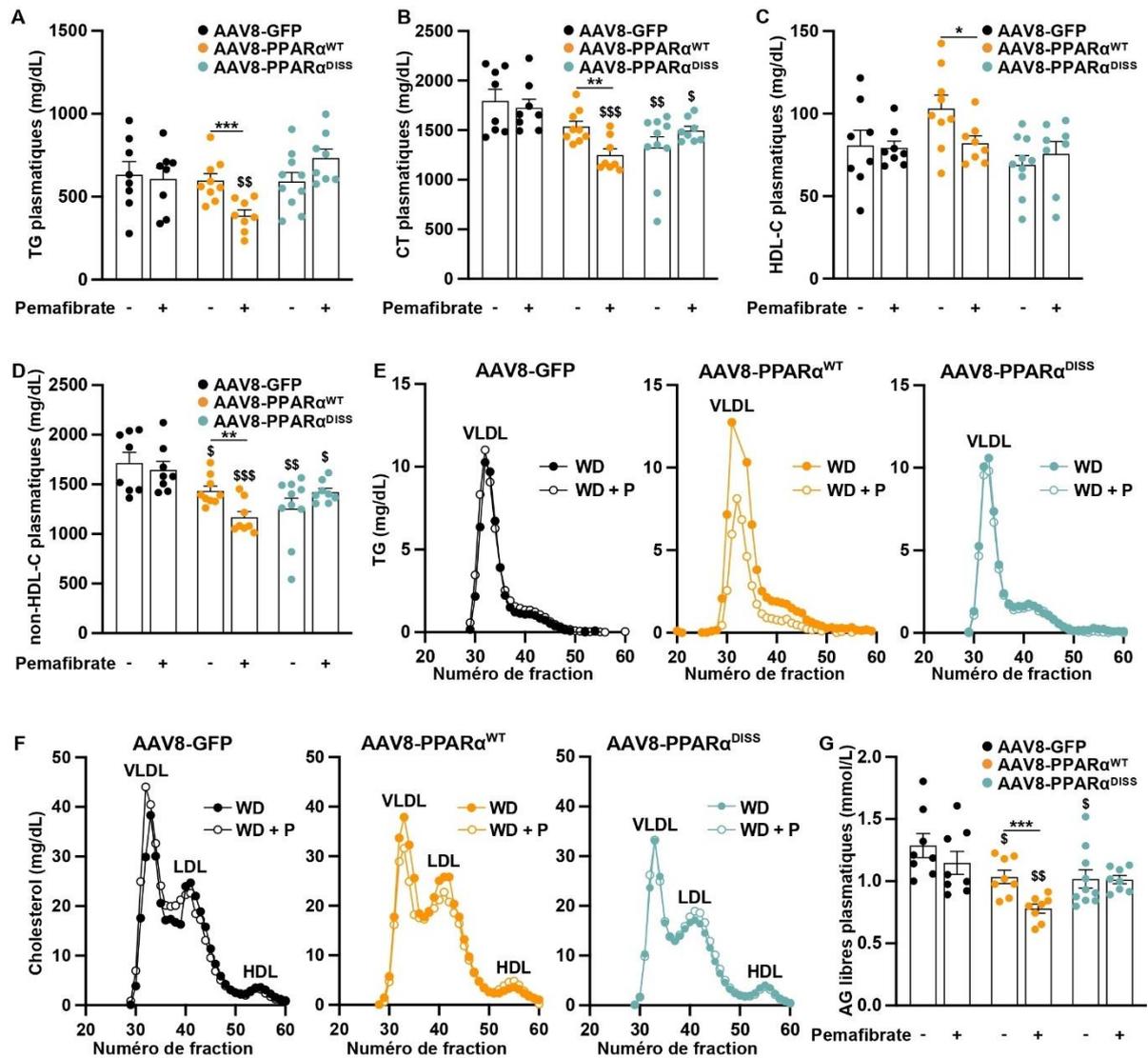
dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> et dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> traitées avec le pemafibrate (**Figure 31A,B**). Par ailleurs, le pemafibrate diminue significativement l'expression hépatique de *Cd36* dans le foie des souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> (**Figure 31A**). Ces résultats confirment que le pemafibrate induit à la fois la transactivation et la transrépression de PPAR $\alpha$  dans le foie des souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>, alors qu'il induit seulement la transrépression dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>. Contrairement aux souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> et *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>, la restauration de PPAR $\alpha$  seulement dans les hépatocytes des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> (AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>) n'améliore pas la stéatose par rapport aux souris AAV8-GFP ce qui suggère un rôle du PPAR $\alpha$  périphérique dans l'amélioration des concentrations de lipides hépatiques dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> comme il a déjà été suggéré auparavant<sup>271</sup> (**Figure 31C,D**). De plus, le pemafibrate diminue drastiquement la stéatose hépatique dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> (-67%) et plus faiblement dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> (-25%). Le pemafibrate n'induit pas de changement sur le score d'inflammation dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> et AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> (**Figure 31E**). Par contre, il diminue le pourcentage de cellules CD68-positives à la fois dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> et AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> indiquant une diminution du nombre de macrophages intra-hépatiques avec le pemafibrate (**Figure 31F,G**).



**Figure 31 : Le pemaifibrate améliore le métabolisme des lipides et l'inflammation hépatique via l'activation spécifique du PPAR $\alpha$  hépatocytaire. (A)** Expression génique dans le foie de *Aco*, *Bien*, *Mcad*, *Lcad*, *Vlcad*, *Cd36*, *Fabp1*, *Fatp1*, *Vldlr* et *Mttp*, impliqués dans le métabolisme des lipides, mesurée par RT-qPCR. **(B)** Expression génique dans le foie de *Nlrp3*, *Caspase-1*, *Il-1 $\beta$* , *Tnf- $\alpha$* , *Saa*, *Ccl3*, *Cxcl2*, *Cx3cl1*, *Mcp-1* et *Cd68*, impliqués dans l'inflammation, mesurée par RT-qPCR. **(C)** Représentation histologique des coupes de foies colorées à l'H&E. Grossissement x200. Bar d'échelle 20  $\mu$ m. **(D)** Score de stéatose estimée sur les coupes histologiques. Stéatose <5%, 0; 5%–33%, 1; 33%–66%, 2; >66%, 3. **(E)** Score d'inflammation estimée sur les coupes histologiques. Pas de foyer = 0 ;  $\leq 2$  foyers = 1 ; >2 foyers = 2. **(F)** Représentation histologique des coupes de foies colorées avec un anticorps anti-CD68. Grossissement x200. Bar d'échelle 20  $\mu$ m. **(G)** Quantification dans le foie du pourcentage de cellules CD68-positives par champ. Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les souris ont été soumises à un régime western supplémenté (+) ou non (-) avec le pemaifibrate. WD=régime western ; WD+P=régime western + pemaifibrate. \*effet du pemaifibrate ;  $\$$ effet génotype. \*or $\$$ p<0.05; \*\*or $\$$ p<0.01; \*\*\*or $\$$ p<0.001; \*\*\*\*or $\$$ p<0.0001.

## V. Le pemafibrate améliore la dyslipidémie athérogène via l'activité de transactivation du PPAR $\alpha$ hépatocytaire

Les concentrations plasmatiques de lipides ont été déterminées dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppar*<sup>-/-</sup> injectées avec un AAV8 à la fin des 8 semaines de régime (**Figure 32**). Le pemafibrate diminue les concentrations plasmatiques de TG et CT dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> mais pas dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> et AAV8-GFP (**Figure 32A,B**). Ces effets observés dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> avec le pemafibrate sont majoritairement associés à une diminution des concentrations plasmatiques de non-HDL-C et à moindre mesure, également à une diminution des concentrations plasmatiques de HDL-C (**Figure 32C,D**). Les profils lipidiques plasmatiques de TG et CT ont montré une diminution de la fraction VLDL et faiblement de la fraction LDL dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> mais pas dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> (**Figure 32E,F**). De plus, les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> traitées avec du pemafibrate présentent des concentrations plasmatiques d'AG libres diminuées, ce qui n'est pas observé dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> (**Figure 32G**). Ensemble, ces résultats montrent que l'activité de transactivation du PPAR $\alpha$  hépatocytaire est suffisante pour améliorer la dyslipidémie athérogène dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>.

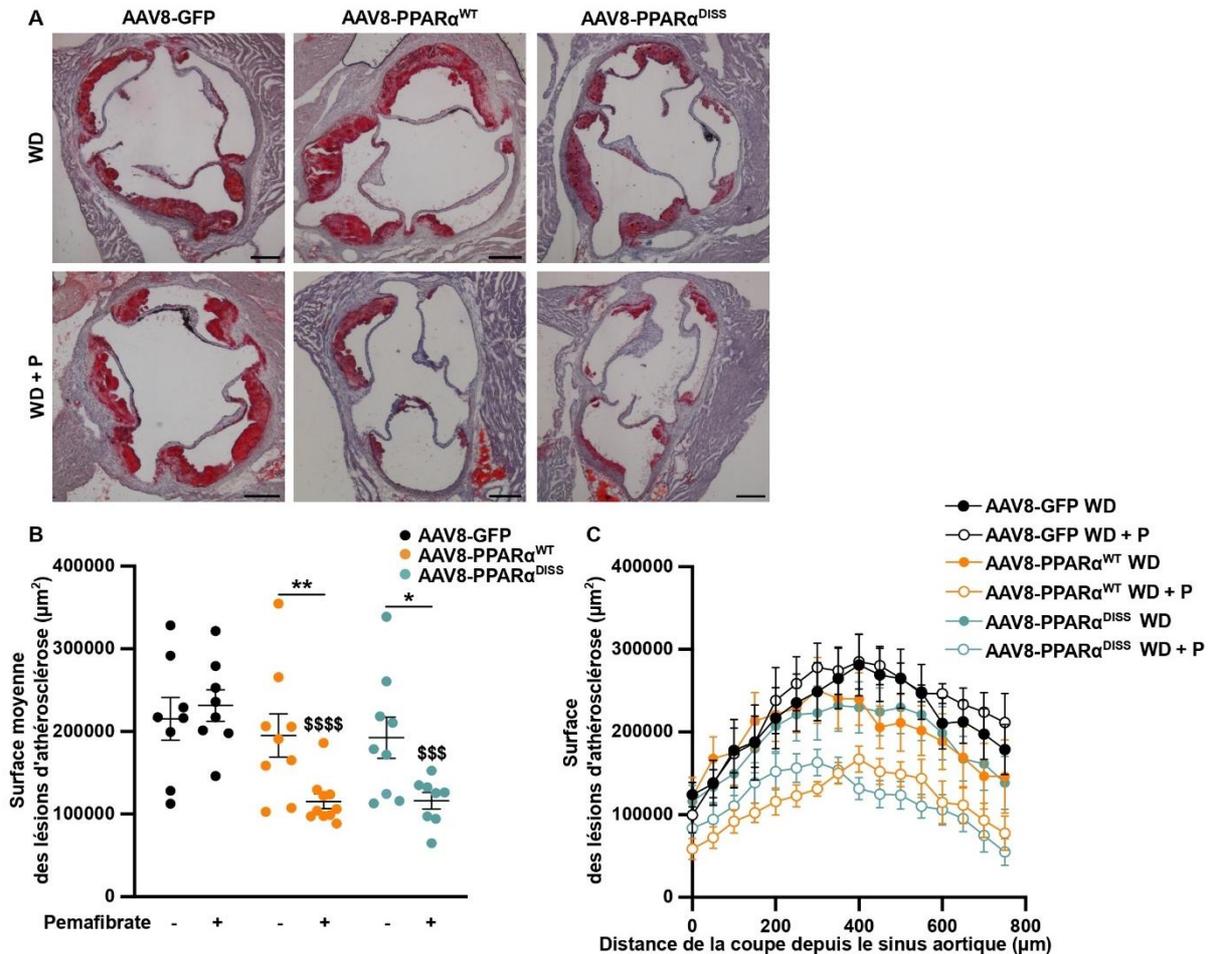


**Figure 32 :** Le pemafibrate améliore la dyslipidémie athérogène via l'activité de transactivation du PPAR $\alpha$  hépatocytaire. Concentrations plasmatiques de (A) TG, (B) CT, (C) HDL-C et (D) non-HDL-C à la fin du régime. (E) Profil lipidique plasmatique de TG déterminé par FPLC dans les plasmas poolés des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppar $\alpha$* <sup>-/-</sup> injectées avec un AAV8. (F) Profil lipidique plasmatique de cholestérol déterminé par FPLC dans les plasmas poolés des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppar $\alpha$* <sup>-/-</sup> injectées avec un AAV8. (G) Concentrations plasmatiques d'AG libres. Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les souris ont été soumises à un régime western supplémenté (+) ou non (-) avec le pemafibrate. WD=régime western ; WD+P=régime western + pemafibrate. \*effet du pemafibrate ; §effet génotype. \*ou<sup>§</sup> $p < 0.05$  ; \*\*ou<sup>§§</sup> $p < 0.01$  ; \*\*\*ou<sup>§§§</sup> $p < 0.001$ .

## VI. Le pemafibrate réduit le développement des lésions d'athérosclérose via l'activité de transrépression de PPAR $\alpha$

Comme le pemafibrate améliore la dyslipidémie via l'activation du PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> hépatocytaire et connaissant l'importance de la dyslipidémie dans le développement de l'athérosclérose<sup>272-274</sup>, nous avons évalué les effets du pemafibrate sur la progression de l'athérosclérose dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> et les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> (Figure 33). De manière surprenante, le

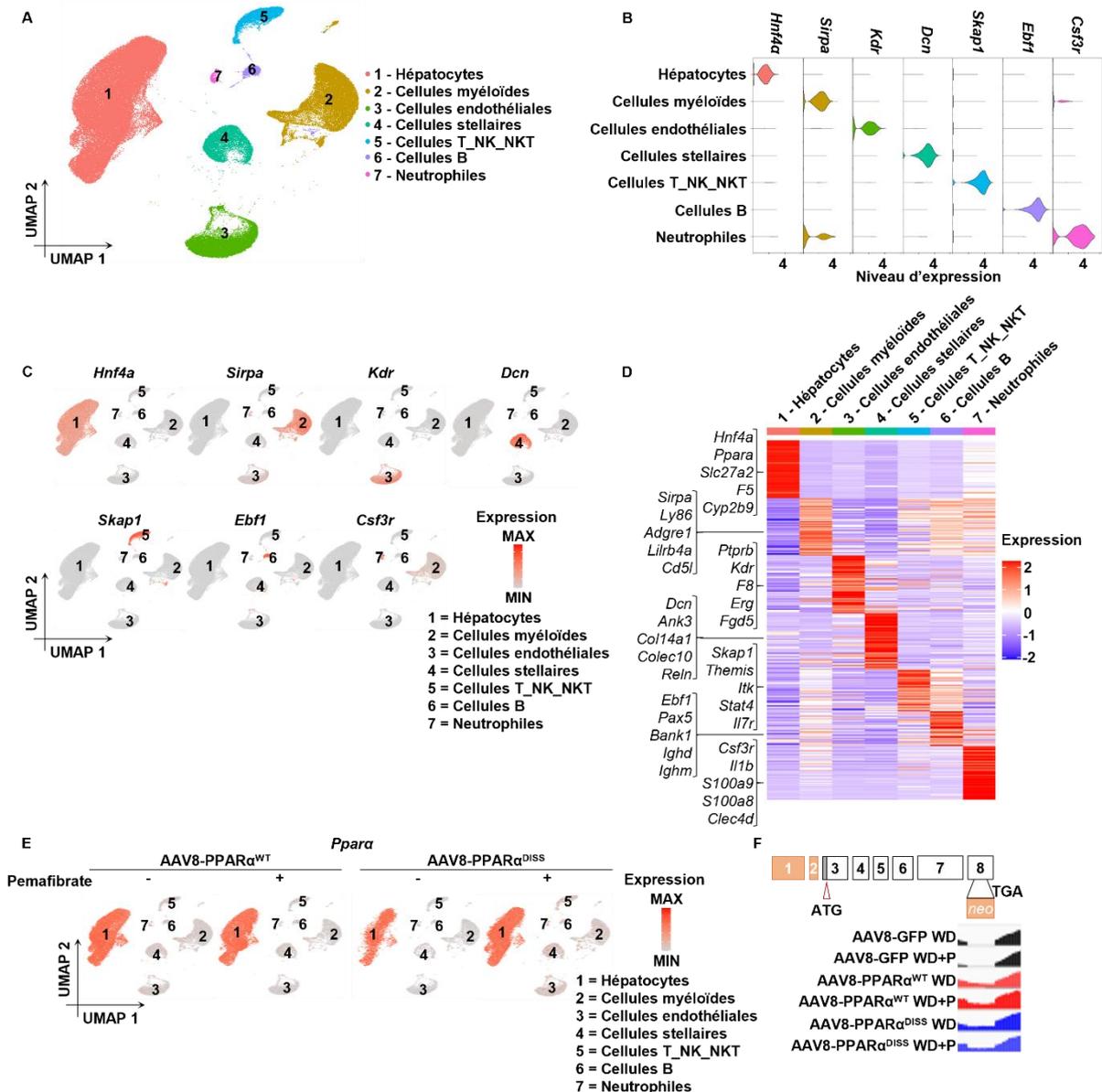
pemafibrate diminue la surface des lésions d'athérosclérose de la même manière dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> et les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> (-42%) (Figure 33A-C). Ces résultats démontrent que l'activation spécifique de la transrépression du PPAR $\alpha$  hépatocytaire par le pemafibrate est suffisante pour diminuer la progression de l'athérosclérose dans le modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup>, indépendamment de l'amélioration de la dyslipidémie athérogène.



**Figure 33 : Le pemafibrate diminue le développement de l'athérosclérose via l'activation de la transrépression du PPAR $\alpha$  hépatocytaire.** (A) Représentation histologique du sinus aortique coloré à l'Oil Red O et contre-coloré à l'H&E. Grossissement x40. Bar d'échelle 100  $\mu$ m (B) Quantification de la surface moyenne des lésions d'athérosclérose en  $\mu$ m<sup>2</sup> des pieds de la valve aortique jusqu'au ventricule. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. (C) Quantification des surfaces de lésions d'athérosclérose tout au long du sinus aortique. Chaque point représente la surface moyenne de la lésion ( $\pm$  SEM) déterminée à une distance spécifique du sinus aortique. Les souris ont été soumises à un régime western supplémenté (+) ou non (-) avec le pemafibrate. WD=régime western ; WD+P=régime western + pemafibrate. \*effet du pemafibrate ;  $\xi$ effet génotype. \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \$\$\$ $p < 0.001$  ; \$\$\$\$ $p < 0.0001$

## VII. Le pémafibrate limite le développement d'un phénotype pro-inflammatoire dans les hépatocytes et réduit le recrutement des leucocytes via l'activité transrépressive du PPAR $\alpha$ hépatocytaire

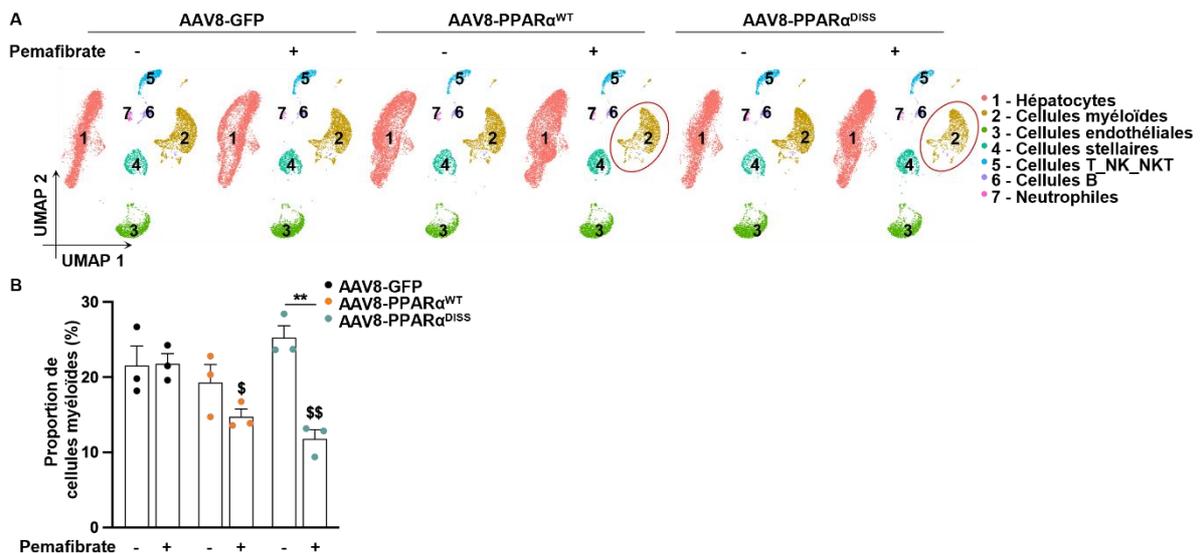
Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans l'activation de la transrépression de PPAR $\alpha$  par le pémafibrate et son lien avec ses effets athéroprotecteurs sur la plaque, nous avons émis l'hypothèse que, via l'activité transrépressive de PPAR $\alpha$ , le pémafibrate diminue la production et la sécrétion hépatique de cytokines et de facteurs pro-inflammatoires, ce qui permettrait de limiter l'inflammation systémique et son impact sur la plaque d'athérosclérose. Pour comprendre les mécanismes impliqués dans le foie, des expériences de snRNA-seq ont été réalisées sur le foie des 6 groupes de souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> injectées avec un AAV8-TBG. L'utilisation de marqueurs connus spécifiques nous a permis de diviser les noyaux en 7 clusters principaux correspondant à un type cellulaire unique : hépatocytes, cellules endothéliales, cellules stellaires, cellules myéloïdes, cellules T\_NK\_NKT, cellules B et neutrophiles (**Figure 34A**). Les marqueurs spécifiques de chacun de ces types cellulaires sont exclusivement exprimés dans les noyaux correspondants (**Figure 34B**). La distribution de l'expression des marqueurs spécifiques est propre à chaque type cellulaire : *Hnf4 $\alpha$*  dans les hépatocytes, *Kdr* dans les cellules endothéliales, *Dcn* dans les cellules stellaires, *Sirp $\alpha$*  dans les cellules myéloïdes, *Skap1* dans les cellules T\_NK\_NKT, *Ebf1* dans les cellules B et *Csf3r* dans les neutrophiles (**Figure 34C**). L'identité de chaque type cellulaire a été confirmée par la suite par l'analyse du top50 gènes différentiellement exprimés dans chaque cluster (**Figure 34D**). L'évaluation de l'expression de *Ppara* dans les noyaux hépatiques des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> restaurées avec un AAV8 a montré une expression de *Ppara* exclusivement dans les hépatocytes, confirmant la restauration spécifique de PPAR $\alpha$  seulement dans les hépatocytes avec le vecteur AAV8-TBG (**Figure 34E,F**).



**Figure 34 :** L'expression hépatique de PPAR $\alpha$  est restreinte aux hépatocytes chez les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> restaurées par AAV8-TBG. **(A)** Visualisation UMAP et clustering des noyaux totaux à partir de l'ensemble de données snRNA-seq (foie des 6 groupes de souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> reconstituées avec un AAV8-TBG) : annotation des 7 principaux clusters basée sur l'expression différentielle de leurs marqueurs spécifiques. **(B)** Expression des marqueurs spécifiques pour chaque type cellulaire. **(C)** Visualisation UMAP montrant l'expression des marqueurs utilisés pour l'identification de chaque groupe. **(D)** Heatmap montrant l'expression des top50 marqueurs de chaque cluster. 5 marqueurs classiques spécifiques de chaque type cellulaire, présents dans le top50, sont présentés. **(E)** Visualisation UMAP de l'expression de *Ppara* dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$ , AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$ -pemafibrate, AAV8-PPAR $\alpha^{DIS}$  et AAV8-PPAR $\alpha^{DIS}$ -pemafibrate. **(F)** Mutation du gène *Ppara* dans l'exon 8 du domaine de liaison au ligand (LBD) remplacé par une cassette Neo dans les souris AAV8-GFP et AAV8-GFP-pemafibrate. Les souris ont été soumises à un régime western supplémenté (+) ou non (-) par le pemafibrate pendant 8 semaines.

Ensuite, nous avons évalué l'impact du pemafibrate sur la proportion de chaque type cellulaire dans les 6 groupes de souris AAV8 (Figure 34A). Comme attendu, les hépatocytes et les cellules myéloïdes sont les deux plus grands clusters de noyaux. Il est intéressant de noter

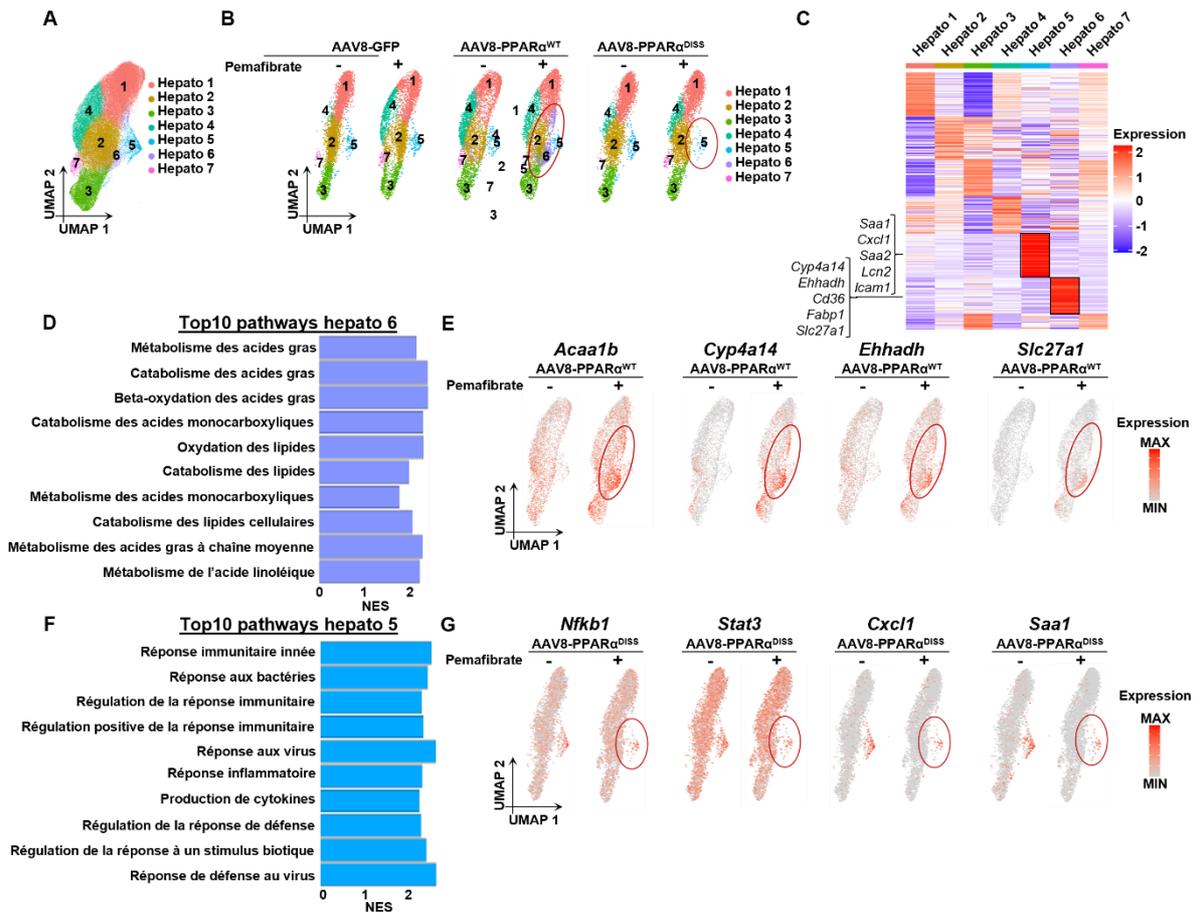
que le pemafibrate réduit fortement le pourcentage de cellules myéloïdes dans le foie des souris AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$  (25 % chez les souris AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$  contre 11 % dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$ -pemafibrate) et tend à diminuer ce pourcentage dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$  (19 % dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$  contre 14 % dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$ -pemafibrate), mais pas dans les souris AAV8-GFP (21 % dans les souris AAV8-GFP vs 21 % dans les souris AAV8-GFP-pemafibrate) (**Figure 35B**).



**Figure 35: Le pemafibrate diminue le nombre de cellules myéloïdes hépatiques via l'activation de la transrépression du PPAR $\alpha$  hépatocytaire. (A)** Visualisation UMAP des clusters séparés par condition expérimentale : AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$ , AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$ -pemafibrate, AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$ , AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$ -pemafibrate, AAV8-GFP, AAV8-GFP-pemafibrate. Le nombre de noyaux totaux a été échantillonné à 10 000 par condition. **(B)** Pourcentage de cellules myéloïdes dans les 6 conditions AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$ , AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$ -pemafibrate, AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$ , AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$ -pemafibrate, AAV8-GFP, AAV8-GFP-pemafibrate. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les souris ont été soumises à un régime western supplémenté (+) ou non (-) par le pemafibrate pendant 8 semaines. \*effet du pemafibrate ; \$effet génotype.  $^{\$}p < 0.05$  ;  $^{**ou\$\$}p < 0.01$ .

Comme PPAR $\alpha$  a été restauré spécifiquement dans les hépatocytes, nous avons analysé en détail le cluster d'hépatocytes, ce qui a permis d'identifier 7 sous-clusters (**Figure 36A**). De manière intéressante, le cluster hepato 6 n'est présent que dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$  et en particulier celles traitées avec le pemafibrate, mais pas dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$  ni dans les souris AAV8-GFP (**Figure 36B**). Parmi le top50 des gènes les plus exprimés dans ce cluster hépato 6, on retrouve des gènes cibles classiques de PPAR $\alpha$  impliqués dans le métabolisme et le transport des AG, tels que *Cyp4a14*, *Ehhadh* (BIEN), *Cd36*, *Fabp1* ou *Slc27a1* (FATP1) (**Figure 36C,E**). Les analyses d'enrichissement de gènes réalisées avec les annotations de *gene ontology biological process* (GOBP) confirment l'enrichissement de ce cluster hepato 6 avec des gènes impliqués dans des voies de signalisation liées au métabolisme des lipides

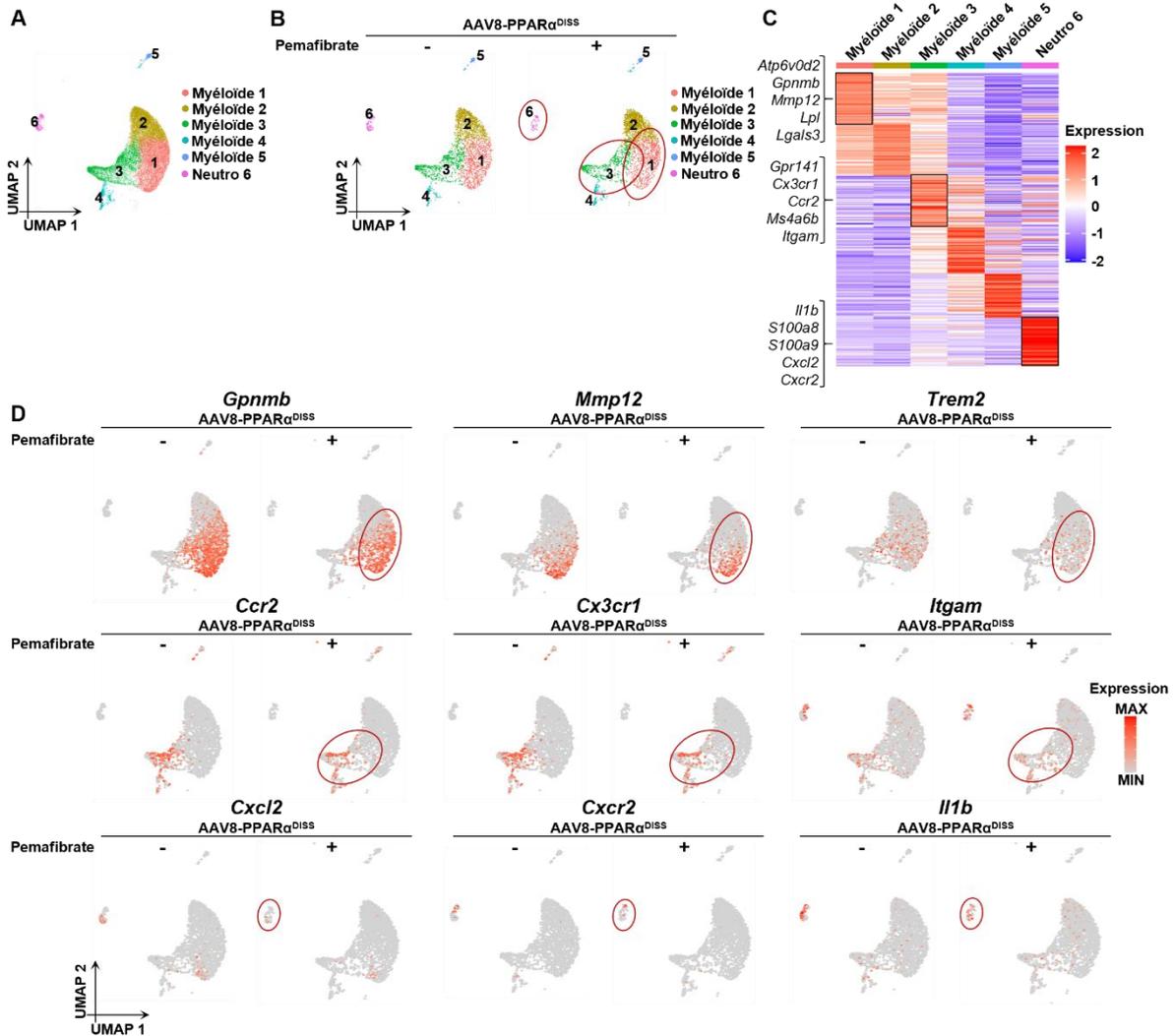
(Figure 36D). Ces résultats indiquent que le pemafibrate régule des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides via la transactivation de PPAR $\alpha$  uniquement dans les hépatocytes des souris AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$ , mais pas dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$  ou AAV8-GFP. En outre, le cluster hepato 5 est fortement diminué par le pemafibrate dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$  (Figure 36B). Parmi les top50 marqueurs de ce cluster, on retrouve des gènes inflammatoires tels que des protéines de la réponse inflammatoire aiguë (*Saa1*, *Saa2*, *Lcn2*), des chimiokines (*Cxcl1*) et des molécules d'adhésion (*Icam1*) (Figure 36C). Le top10 des voies de signalisation GOBP dans ce cluster hepato 5 révèle l'enrichissement du cluster hepato 5 avec des gènes liés à la régulation de la réponse immunitaire et de la production de cytokines, ce qui nous a permis de le caractériser comme des « hépatocytes pro-inflammatoires » (Figure 36F). L'expression de gènes spécifiques de la réponse inflammatoire présents dans ce cluster est diminuée par le pemafibrate dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$  (Figure 35G). Ainsi, l'activation par le pemafibrate de l'activité transrépressive de PPAR $\alpha$  empêche le développement d'un phénotype hépatocytaire pro-inflammatoire, conduisant à une réduction de l'expression des protéines et chimiokines pro-inflammatoires.



**Figure 36 :** Le pemafibrate bloque le développement d'un phénotype pro-inflammatoire hépatocytaire via l'activation de la transrépression du PPAR $\alpha$  hépatocytaire. **(A)** Visualisation UMAP des sous-clusters d'hépatocytes des données de *snRNA-seq* réalisée avec Seurat et une résolution de 0.5. **(B)** Visualisation UMAP des sous-clusters d'hépatocytes séparés par condition expérimentale : AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$ , AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$ -pemafibrate, AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$ , AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$ -pemafibrate, AAV8-GFP, AAV8-GFP-pemafibrate. Le nombre de noyaux totaux a été échantillonné à 4 000 par condition. **(C)** Heatmap montrant l'expression des top50 marqueurs de chaque sous-cluster d'hépatocytes. 5 marqueurs spécifiques de chaque sous-cluster présents dans le top50 sont présentés. **(D)** Enrichissement des voies de signalisation GOBP réalisées avec les gènes dérégulés dans le cluster hepatocyte 6. Le top10 des voies dont la *p* value ajustée est la plus faible est présenté. **(E)** Visualisation UMAP de l'expression des gènes enrichis dans le cluster hepatocyte 6 dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$  et AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$ -pemafibrate. **(F)** Enrichissement des voies de signalisation GOBP réalisées avec les gènes dérégulés dans le cluster hepatocyte 5. Le top10 des voies dont la *p* value ajustée est la plus faible est présenté. **(G)** Visualisation UMAP de l'expression des gènes enrichis dans le cluster hepatocyte 5 dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$  et AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$ -pemafibrate. Les souris ont été soumises à un régime western supplémenté (+) ou non (-) par le pemafibrate pendant 8 semaines. Hepato = Hépatocytes ; NES = Score d'enrichissement normalisé.

Afin d'évaluer l'impact de l'amélioration du phénotype pro-inflammatoire hépatocytaire par le pemafibrate sur les cellules immunes, nous avons ensuite analysé les clusters de neutrophiles et de cellules myéloïdes. En plus du cluster de neutrophiles, les cellules myéloïdes ont été divisées en 5 sous-clusters (Figure 37A). De manière intéressante, le pemafibrate entraîne une diminution des clusters myéloïdes 1 et 3 ainsi que du cluster de neutrophiles dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$  (Figure 37B). Le cluster myéloïde 1 est enrichi en marqueurs de

macrophages tels que *Lgals3* et en marqueurs caractéristiques de macrophages associés aux lipides (lipid-associated macrophages, LAM) *Gpnmb*, *Mmp12* ou *Trem2*. Le cluster myéloïde 3 exprime des gènes tels que le marqueur de monocyte/macrophage *Itgam*, les récepteurs de chimiokine *Ccr2* et *Cx3cr1*, connus pour induire le recrutement des monocytes et des macrophages sur les sites d'inflammation. Le cluster de neutrophiles est enrichi en *Cxcl2*, un puissant chimioattractant de neutrophiles, et en *Cxcr2*, son récepteur, ainsi qu'en *Il1b*, une cytokine pro-inflammatoire majeure (**Figure 37C,D**). Ces résultats suggèrent que la réduction du phénotype inflammatoire induite par le pemafibrate dans les hépatocytes entraîne une réduction de LAM, possiblement grâce à une réduction du recrutement des monocytes médié par CCR2 et du recrutement des neutrophiles médié par CXCR2, ce qui conduit à une réduction de production et sécrétion de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$ .

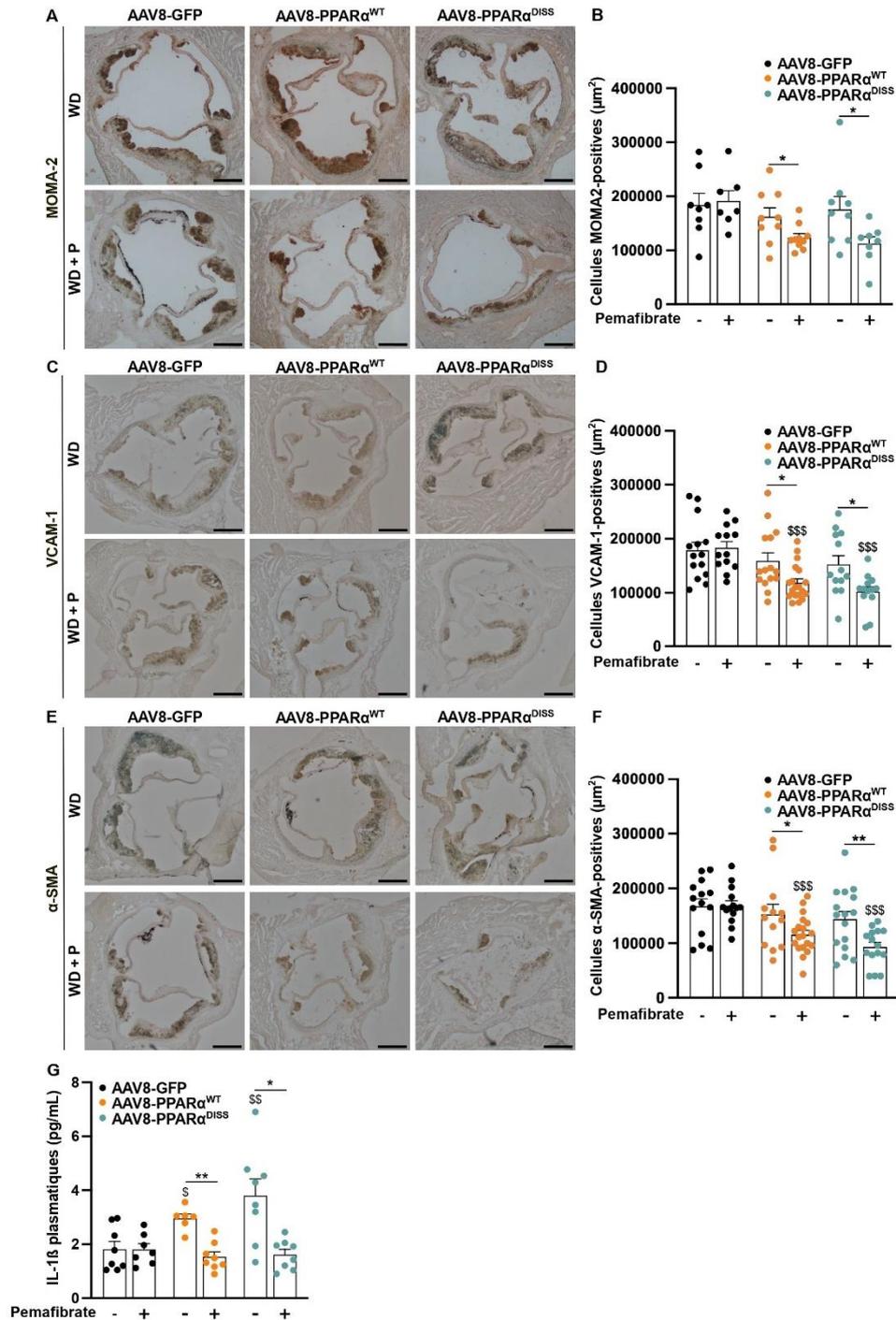


**Figure 37 : Le pemafibrate diminue le nombre de monocytes et neutrophiles recrutés dans le foie ainsi que le nombre de LAMs via l'activation de la transrépression du PPAR $\alpha$  hépatocytaire. (A) Visualisation UMAP et clustering des cellules myéloïdes et des neutrophiles des données de snRNA-seq réalisée avec Seurat et une résolution de 0.8. (B) Visualisation UMAP des sous-clusters d'hépatocytes dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{Diss}$  et AAV8-PPAR $\alpha^{Diss}$ -pemafibrate. Le nombre de noyaux a été échantillonné à 2 000 par condition. (C) Heatmap montrant l'expression des top50 marqueurs de chaque sous-cluster de cellules myéloïdes et de neutrophiles. 5 marqueurs spécifiques de chaque sous-cluster présents dans le top50 sont présentés. (D) Visualisation UMAP de l'expression des gènes enrichis dans les sous-clusters de cellules myéloïdes 1 et 3 et dans les neutrophiles, dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{Diss}$  et AAV8-PPAR $\alpha^{Diss}$ -pemafibrate. Les souris ont été soumises à un régime western supplémenté (+) ou non (-) par le pemafibrate pendant 8 semaines. Myéloïde = cellules myéloïdes ; Neutro = neutrophiles.**

Pour caractériser les conséquences de l'inflammation sur la plaque d'athérosclérose, des immunomarquages MOMA-2 (marqueur de monocytes/macrophages) et VCAM-1 (molécule d'adhésion) ont été réalisés dans la plaque d'athérosclérose au niveau de la surface maximale quantifiée en Oil Red O (**Figure 38A-D**). Les quantifications des cellules MOMA-2-positives révèlent que le pemafibrate réduit le nombre de macrophages dans les plaques d'athérosclérose des souris AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$  et AAV8-PPAR $\alpha^{Diss}$ , mais pas des souris AAV8-GFP

(Figure 38A,B). Parallèlement à la diminution du nombre de macrophages, l'expression de VCAM-1 est également significativement diminuée dans les lésions d'athérosclérose des souris AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$  et AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$  traitées avec le pemafibrate (Figure 38C,D). Cela suggère que l'activation de la transrépression du PPAR $\alpha$  hépatocytaire par le pemafibrate conduit à une réduction à distance de l'expression de VCAM-1 et donc probablement de l'adhésion des monocytes à la paroi vasculaire, ce qui limite la quantité de macrophages dans la plaque et par conséquent le développement de l'athérosclérose. Connaissant le rôle de l'IL-1 $\beta$  dans la prolifération et la différenciation des CML, des immunomarquages d' $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), un marqueur de CML, ont également été réalisés dans la plaque d'athérosclérose (Figure 38E,F). L'évaluation quantitative de l' $\alpha$ -SMA montre une réduction significative des CML  $\alpha$ -SMA-positives dans la plaque d'athérosclérose des souris AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$  et AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$ .

Enfin, les concentrations plasmatiques d'IL-1 $\beta$ , une cytokine majeure impliquée dans le développement de l'athérosclérose dont l'expression hépatique est significativement diminuée dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$  et AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$ , sont diminuées par le pemafibrate dans les souris AAV8-PPAR $\alpha^{WT}$  et AAV8-PPAR $\alpha^{DISS}$  (Figure 38G). Ces données suggèrent que l'IL-1 $\beta$  pourrait être le lien entre la réduction de l'inflammation hépatique par le pemafibrate et ses effets athéroprotecteurs à distance.



**Figure 38 : Le pema-fibrate diminue les concentrations plasmatiques d'IL-18 et le nombre de macrophages dans la plaque d'athérosclérose via l'activation de la transrépression du PPARα hépatocytaire. (A)** Représentation histologique du sinus aortique marqué avec l'anticorps MOMA-2. Grossissement x40. Bar d'échelle 100 µm **(B)** Quantification, au maximum de la surface de la plaque, des cellules MOMA-2-positives **(C)** Représentation histologique du sinus aortique marqué avec un anticorps anti-VCAM-1. Grossissement x40. Bar d'échelle 100 µm **(D)** Quantification, au maximum de la surface de la plaque, des cellules VCAM-1-positives. **(E)** Représentation histologique du sinus aortique marqué avec un anticorps anti-α-SMA. Grossissement x40. Bar d'échelle 100 µm **(F)** Quantification, au maximum de la surface de la plaque, des cellules α-SMA-positives **(G)** Concentrations plasmatiques d'IL-18 mesurées à la fin du régime dans les souris *Ldlr<sup>-/-</sup> Pparα<sup>-/-</sup>* injectées avec un AAV8-TBG. Les souris ont été soumises à un régime western supplémenté (+) ou non (-) avec le pema-fibrate. WD=régime western ; WD+P=régime western + pema-fibrate. \*effet du pema-fibrate ; §effet génotype. \*ou<sup>§</sup>*p*<0.05 ; \*\*ou<sup>§§</sup>*p*<0.01 ; <sup>§§§</sup>*p*<0.001.

## **PARTIE 2 : DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU MODELE MURIN** **PERTINENT DE MASLD ET D'ATHEROSCLEROSE**

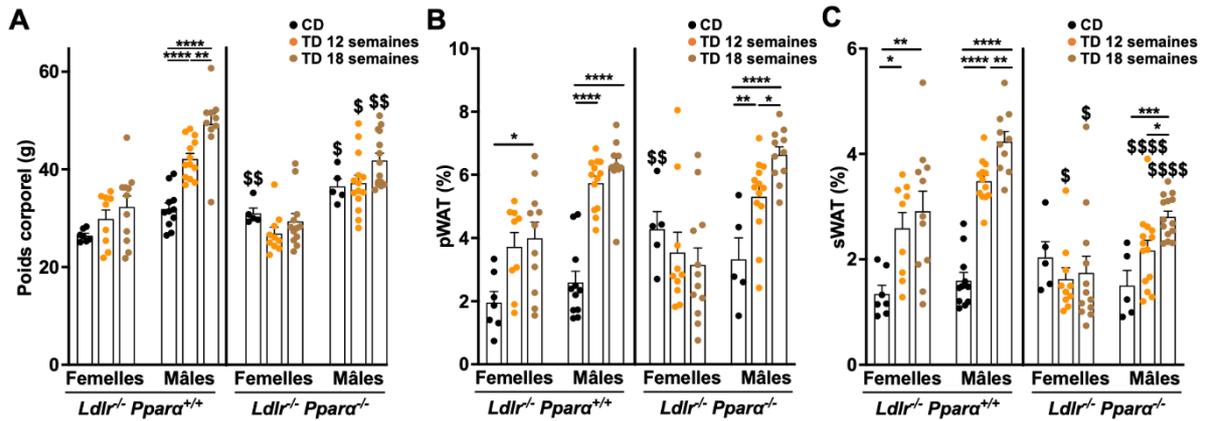
Le 2<sup>ème</sup> objectif de ma thèse a visé à développer un nouveau modèle murin associant à la fois un développement progressif de MASLD et d'athérosclérose dans un contexte cardiométabolique mimant la pathologie humaine. En effet, dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>, le régime western est suffisant pour induire de l'athérosclérose mais il ne permet pas de développer, au niveau du foie, une MASH sévère avec une forte inflammation hépatique et un développement de ballooning et de fibrose. Pour cela, des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> et *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mâles et femelles ont été soumises à un régime TD enrichi en graisses et en cholestérol par comparaison au régime standard chow. Deux sacrifices ont été réalisés à 12 et 18 semaines afin d'évaluer la cinétique d'évolution de la MASLD et de l'athérosclérose, de déterminer l'impact de la déficience en PPAR $\alpha$  et d'étudier un potentiel dimorphisme sexuel dans le développement de ces deux pathologies.

Les résultats de cette étude ont été valorisés par le dépôt d'un brevet via INSERM transfert (**Annexe 2**).

### **I. Dimorphisme sexuel et impact de la déficience en PPAR $\alpha$ sur les caractéristiques métaboliques des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> en réponse au régime TD**

Comme attendu sous régime riche en graisses, les souris mâles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> développent significativement de l'obésité sous TD, avec une prise de poids nettement plus importante que dans les souris femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> au cours des 18 semaines de régime (**Figure 39A**). De manière intéressante, les souris mâles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> sont protégées de cette obésité par rapport aux souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>.

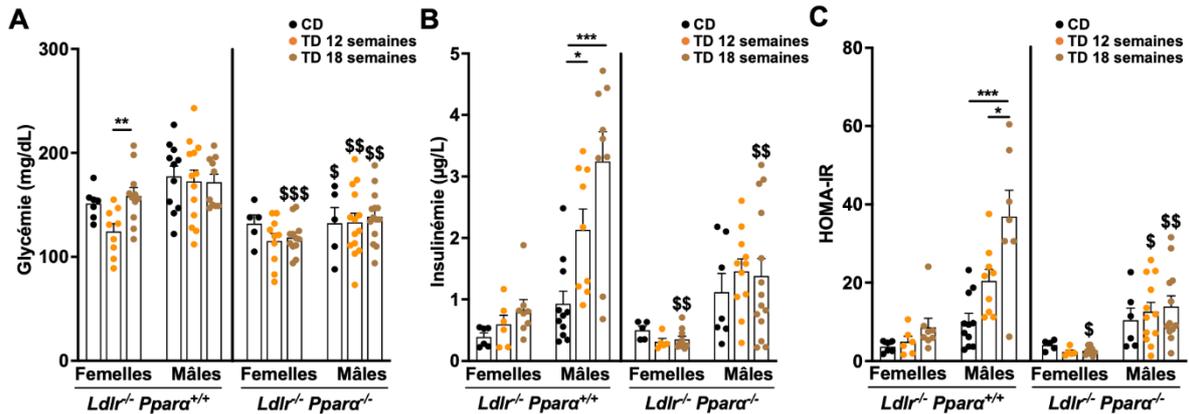
De plus, à la fin des 12 et 18 semaines, les tissus adipeux périgonadiens (pWAT) et sous-cutanés (sWAT) ont été collectés et pesés, et leur poids a été exprimé en pourcentage par rapport au poids total de la souris (**Figure 39B-C**). Le poids relatif de pWAT et de sWAT est significativement augmenté et de manière importante dans les souris mâles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>, effet qui est beaucoup moins prononcé dans les souris femelles ou en cas de déficience en *Ppara* (**Figure 39B-C**).



**Figure 39 :** Le régime TD induit de l'obésité dans les souris mâles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>. (A) Poids corporel, poids du tissu adipeux (B) péri-gonadien et (C) sous-cutané normalisés par rapport au poids total des souris. Les souris ont été soumises à un régime standard ou à un régime TD pendant 12 et 18 semaines. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. (n=4-11 souris/groupe dans le régime CD, n=9-14 souris/groupe dans le régime TD). CD = chow diet, pWAT = tissu adipeux péri-gonadien, sWAT = tissu adipeux sous-cutané. \*effet du régime ; <sup>§</sup>effet génotype. \*ou<sup>§</sup>p<0.05 ; \*\* ou<sup>§§</sup>p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 ; \*\*\*\*ou<sup>§§§§</sup>p<0.0001.

Par ailleurs, le régime TD n'induit pas de modification de la glycémie dans les souris mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> à 12 et 18 semaines (Figure 40A). Cependant, comme déjà observé dans d'autres modèles, la déficience en PPAR $\alpha$  dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> induit une diminution de la glycémie à la fois dans les souris mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup>.

Concernant l'insulinémie, le régime TD induit une augmentation des concentrations plasmatiques d'insuline à 12 et 18 semaines dans les souris mâles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> (Figure 40B). Les mesures de glycémie et d'insulinémie nous ont permis de calculer l'HOMA-IR afin de quantifier la résistance à l'insuline (Figure 40C). Le régime TD induit une augmentation du score HOMA-IR à 12 et 18 semaines dans les souris mâles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>, indiquant le développement d'une IR dans ces souris, en lien avec le développement d'une obésité sous TD.



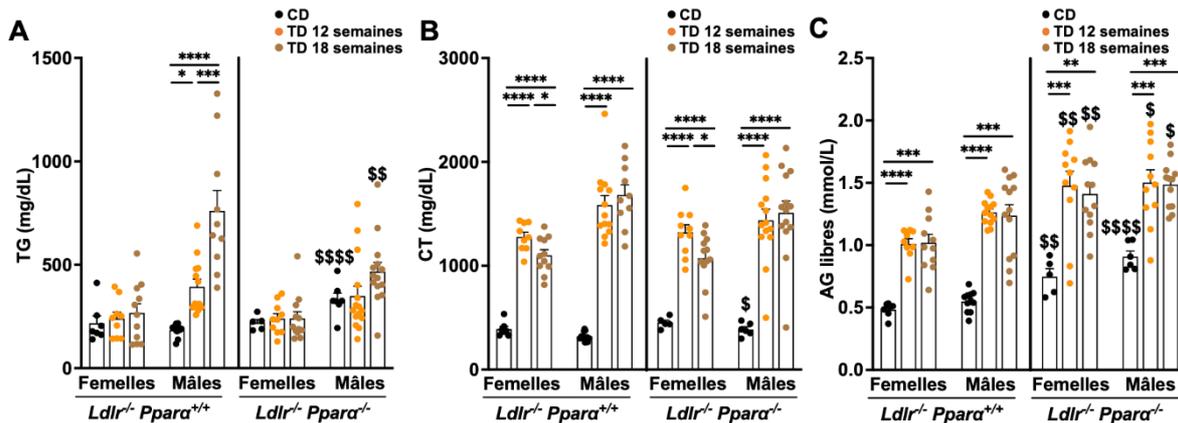
**Figure 40 : Le régime TD induit une insulino-résistance dans les souris mâles  $Ldlr^{-/-}$   $Ppara^{+/+}$ .** (A) Glycémie et (B) insulinémie à jeun. (C) Homeostatic model for assessment of insulin resistance (HOMA-IR) calculé à partir de la glycémie et des niveaux d'insuline à jeun. Les souris ont été soumises à un régime standard ou à un régime TD pendant 12 et 18 semaines. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. ( $n=4-11$  souris/groupe dans le régime CD,  $n=9-14$  souris/groupe dans le régime TD). CD= chow diet. \*effet du régime ;  $^{\$}$ effet génotype. \*ou $^{\$}$  $p<0.05$  ; \*\* ou $^{\$\$}$  $p<0.01$  ; \*\*\*ou $^{\$ \$ \$}$  $p<0.001$ .

Ainsi, ces résultats montrent que le régime TD peut induire certaines caractéristiques du syndrome métabolique comme l'obésité et l'IR dans les souris  $Ldlr^{-/-}$ . De manière intéressante, l'obésité et l'IR sont beaucoup plus marquées dans les souris mâles que dans les femelles, et la déficience en PPAR $\alpha$  semble être protectrice face à ces effets.

## II. Dimorphisme sexuel et impact de la déficience en PPAR $\alpha$ sur les concentrations plasmatiques de lipides des souris $Ldlr^{-/-}$ en réponse au régime TD

A la fin des 12 et 18 semaines de régime TD, les concentrations plasmatiques de TG, CT et AG libres ont été mesurées dans les différents groupes de souris (Figure 41).

Le régime TD entraîne une augmentation significative et progressive des concentrations plasmatiques de TG à 12 et 18 semaines, mais uniquement dans les souris mâles  $Ldlr^{-/-}$   $Ppara^{+/+}$  (Figure 41A). Cependant, les souris mâles et femelles, à la fois  $Ldlr^{-/-}$   $Ppara^{+/+}$  et  $Ldlr^{-/-}$   $Ppara^{-/-}$ , développent une augmentation des taux plasmatiques de CT (Figure 41B) et d'AG libres (Figure 41A-C). De plus, à 12 et 18 semaines de régime TD, la déficience en PPAR $\alpha$  induit une augmentation plus importante des concentrations plasmatiques d'AG libres, à la fois dans les souris mâles et femelles. (Figure 41A-C).



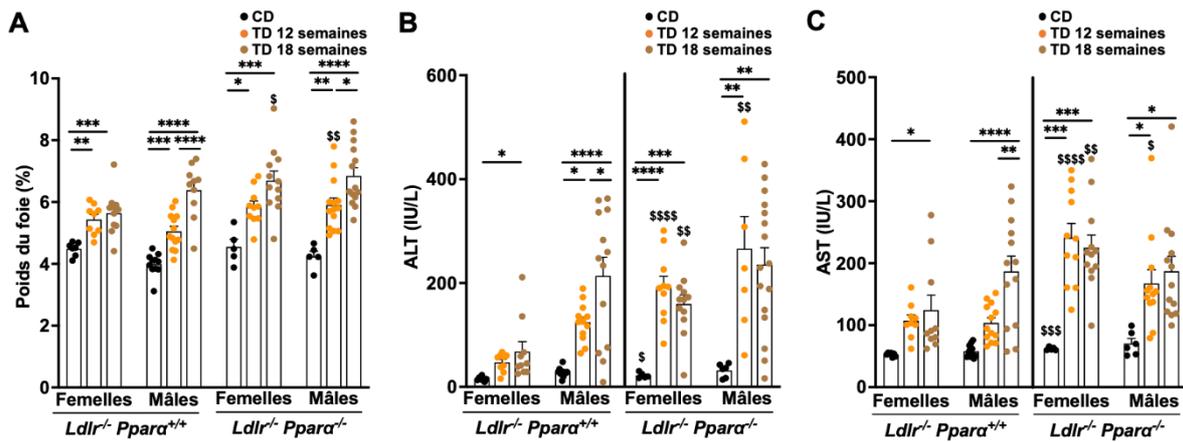
**Figure 41 :** Le régime TD augmente les concentrations plasmatiques de lipides et d'AG libres dans les souris mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> déficientes ou non pour *PPAR*α. Concentrations plasmatiques de (A), TG, (B) CT et (C) AG libres mesurées à la fin du régime TD. Les souris ont été soumises à un régime standard ou à un régime TD pendant 12 et 18 semaines. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. (n=4-11 souris/groupe dans le régime CD, n=9-14 souris/groupe dans le régime TD). CD= chow diet. \*effet du régime ; <sup>§</sup>effet génotype. \*ou<sup>§</sup>p<0.05 ; \*\* ou<sup>§§</sup>p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 ; \*\*\*\*ou<sup>§§§§</sup>p<0.0001.

Ces résultats montrent que le régime TD induit une augmentation des concentrations plasmatiques de CT et d'AG libres dans les souris mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> et *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>, comme cela a déjà été décrit chez l'Homme au cours du développement de la MASH<sup>275</sup>.

### III. Dimorphisme sexuel et impact de la déficience en *PPAR*α sur le développement de la MASH dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> en réponse au régime TD

A la fin des 12 et 18 semaines de régime, le foie a été prélevé et pesé afin d'exprimer son poids en pourcentage par rapport au poids total de la souris. Le régime TD augmente le poids relatif du foie au cours du temps dans les souris mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>, ce qui est aggravé par la déficience en *PPAR*α (Figure 42A).

De plus, le régime TD induit une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques ALT et AST dans les souris mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>, ce qui est également exacerbé par la déficience en *PPAR*α (Figure 42B-C).



**Figure 42 : Le régime TD induit une atteinte hépatique dans les souris mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> déficientes ou non pour *PPAR* $\alpha$ .** (A) Poids du foie normalisé par rapport au poids total des souris. Concentrations plasmatiques des enzymes hépatiques (B) ALT et (C) AST mesurées à la fin du régime. Les souris ont été soumises à un régime standard (CD) ou à un régime TD pendant 12 et 18 semaines. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. (n=4-11 souris/groupe dans le régime CD, n=9-14 souris/groupe dans le régime TD). CD= chow diet. \*effet du régime ; §effet génotype. \*ou<sup>§</sup>p<0.05 ; \*\* ou<sup>§§</sup>p<0.01 ; \*\*\* ou<sup>§§§</sup>p<0.001 ; \*\*\*\*ou<sup>§§§§</sup>p<0.0001.

Pour évaluer l'impact du dimorphisme sexuel et l'influence de la déficience en *PPAR* $\alpha$  sur la progression de la MASH induite par le régime TD, des analyses histologiques ont été réalisées sur des coupes de foie colorées à l'H&E (Figure 43A). A partir de ces coupes de foie, la stéatose hépatique (0-3), l'inflammation (0-2) et le ballooning (0-2) ont été évalués selon le système de scoring de Bedossa<sup>34</sup>. En réponse au régime TD, une stéatose hépatique est clairement observée dans le foie des différents groupes de souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> à 12 semaines, avec une augmentation au cours du temps entre la 12<sup>ème</sup> et la 18<sup>ème</sup> semaine (Figure 43B). Les souris mâles présentent un score de stéatose plus élevé que les femelles, sans aucun impact de la déficience en *PPAR* $\alpha$ .

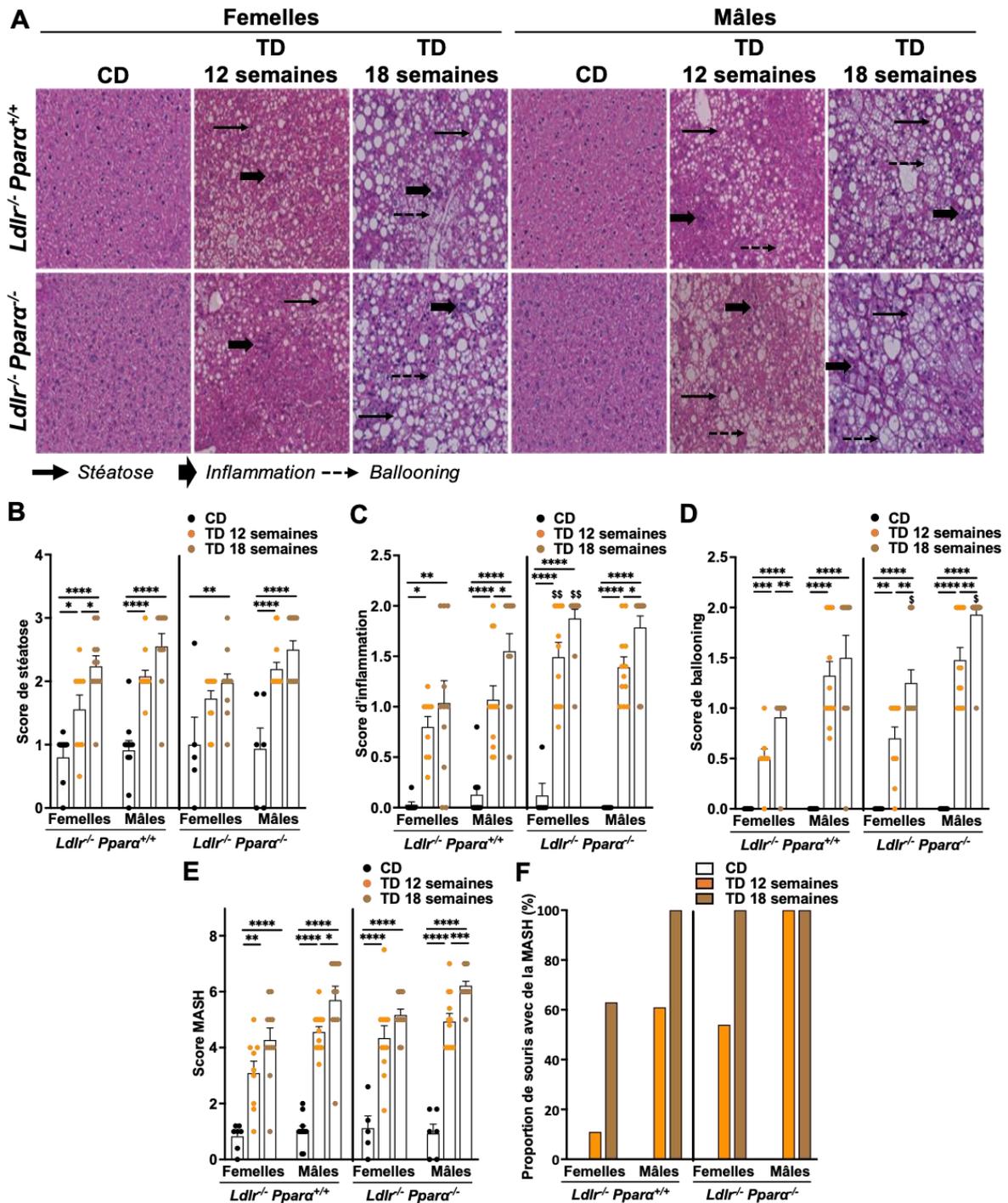
A 12 semaines, l'inflammation hépatique est également présente dans le foie des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> et cette inflammation augmente au cours du temps entre la 12<sup>ème</sup> et la 18<sup>ème</sup> semaine de régime TD (Figure 43C). De manière intéressante, la déficience en *PPAR* $\alpha$  aggrave le score d'inflammation à 12 et 18 semaines dans les souris femelles, un effet qui n'est pas observé chez les mâles.

Enfin, le régime TD induit peu de ballooning hépatique dans les souris femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> à 12 semaines mais il l'augmente clairement à 18 semaines (Figure 43D). Dans les souris mâles *Ldlr*<sup>-/-</sup> à 12 semaines, le score de ballooning est déjà bien plus important par rapport aux souris femelles. Il n'évolue pas au cours du régime mais reste quand même plus élevé dans les souris mâles que dans les souris femelles à 18 semaines. De manière intéressante, la déficience en

PPAR $\alpha$  ne modifie pas le score de ballooning à 12 semaines dans les souris mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup>, mais l'aggrave de manière significative dans les deux sexes à 18 semaines.

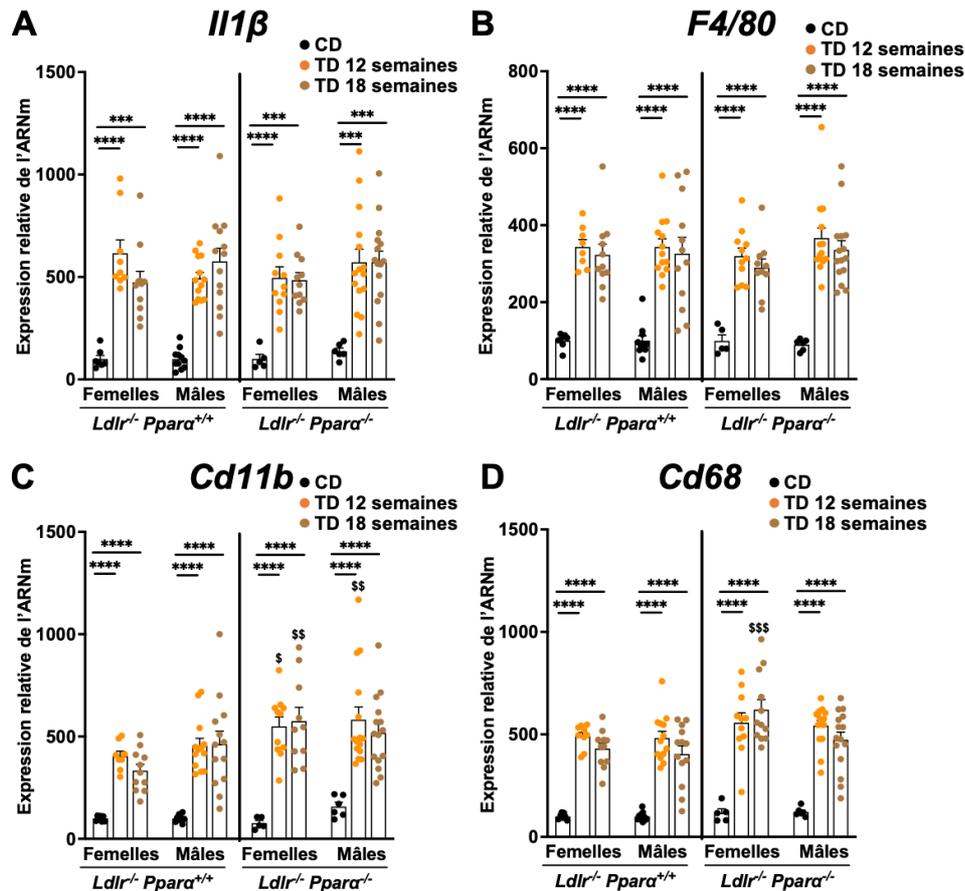
La somme de ces 3 caractéristiques (stéatose, inflammation, ballooning) nous a permis d'établir un score MASH allant de 0 à 7. Le score MASH augmente sous régime TD dans tous les groupes de souris entre 12 et 18 semaines, avec des scores aggravés dans les souris mâles comparés aux femelles et en cas de déficience en PPAR $\alpha$  (Figure 43E).

Enfin, selon l'algorithme de Bedossa, lorsque la stéatose, l'inflammation et le ballooning atteignent au moins le stade 1, le patient est classé dans la catégorie MASH<sup>34</sup>. Selon cet algorithme, nous avons déterminé dans chaque groupe le nombre de souris catégorisées comme MASH (Figure 43F). A 12 semaines, seulement 11% des souris femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> sont catégorisés comme MASH contre 54% des souris femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>. Chez les mâles à 12 semaines, 63% des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> sont considérés comme MASH contre 100% des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>. Le régime TD induit une augmentation de ce pourcentage entre la semaine 12 et la semaine 18 dans tous les groupes de souris sauf dans les souris mâles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> qui présentent déjà 100% des souris avec MASH à 12 semaines. De plus, de manière intéressante, à 18 semaines, toutes les souris mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> déficientes en PPAR $\alpha$  ainsi que les souris mâles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> présentent de la MASH.



**Figure 43 : Le régime TD induit de la MASH chez les mâles et les femelles *Ldlr<sup>-/-</sup>* déficients ou non pour *PPAR $\alpha$* .** (A) Représentations histologiques des foies colorés à l'H&E. Grossissement x200. (B) Score de stéatose estimée sur les coupes histologiques. Stéatose <5% = 0; 5%–33% = 1; 33%–66% = 2; >66% = 3. (C) Score d'inflammation estimée sur les coupes histologiques. Pas de foyer = 0; ≤2 foyers = 1; >2 foyers = 2. (D) Score de ballooning estimé sur les coupes histologiques. Pas de ballooning = 0; présence d'hépatocytes arrondis avec un cytoplasme rose pâle = 1; présence d'hépatocytes élargis (2 fois plus gros que les hépatocytes normaux), arrondis avec un cytoplasme rose pâle = 2. (E) Score de MASH déterminé selon le scoring de Bedossa. Les souris avec un score de 1 sont caractérisées comme MASH. (F) Pourcentage de souris catégorisée comme MASH dans chaque groupe. Les souris ont été soumises à un régime standard (CD) ou à un régime TD pendant 12 et 18 semaines. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. (n=4-11 souris/groupe dans le régime CD, n=9-14 souris/groupe dans le régime TD). CD= chow diet. \*effet du régime ; §effet génotype. \*ou§p<0.05 ; \*\* ou§§p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 ; \*\*\*\* p<0.0001.

Les analyses histologiques ont été complétées par des analyses de l'expression hépatique de gènes impliqués dans la pathophysiologie de la MASH en commençant par des gènes liés à l'inflammation. Comme attendu, comparé au régime chow, le régime TD augmente fortement l'expression des gènes inflammatoires *Il-1 $\beta$* , *F4/80*, *Cd11b* et *Cd68* à 12 semaines dans les souris mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> (Figure 44). Le régime TD n'induit pas de modifications de l'expression de ces gènes dans le foie au cours du temps entre la 12<sup>ème</sup> et la 18<sup>ème</sup> semaine. De plus, dans les souris mâles, la déficience en PPAR $\alpha$  n'induit pas de changement de l'expression hépatique de ces gènes à 12 et 18 semaines. Par contre, dans les souris femelles, alors que l'expression hépatique d'*Il-1 $\beta$*  et *F4/80* n'est pas affectée (Figure 44A,B), la déficience en PPAR $\alpha$  augmente l'expression de *Cd11b* et *Cd68* dans le foie à 12 et 18 semaines (Figure 44C,D). Ces résultats confirment les analyses histologiques démontrant un score d'inflammation plus élevé dans les souris femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> à 12 et 18 semaines.



**Figure 44 :** Le régime TD induit l'expression hépatique de gènes impliqués dans l'inflammation dans les souris mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> déficientes ou non pour *PPAR* $\alpha$ . Expression génique dans le foie de (A) *Il1 $\beta$* , (B) *F4/80*, (C) *Cd11b*, (D) *Cd68* impliqués dans l'inflammation mesurée par RT-qPCR. Les souris ont été soumises à un régime standard (CD) ou à un régime TD pendant 12 et 18 semaines. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. (n=4-11 souris/groupe dans le régime CD, n=9-14 souris/groupe dans le régime TD). CD= chow diet. \*effet du régime ; §effet génotype. § $p < 0.05$  ; §§ $p < 0.01$  ; \*\*\*ou \$\$\$ $p < 0.001$  ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

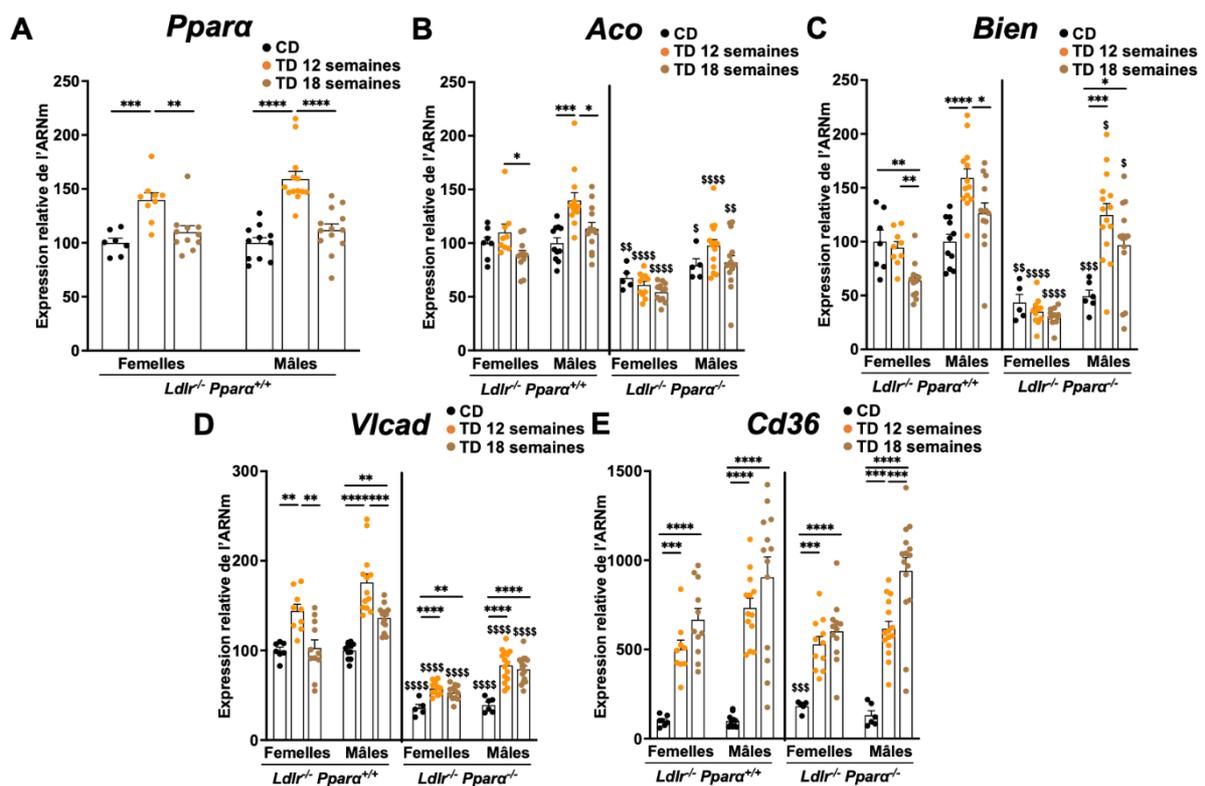
Ensuite, nous avons évalué l'expression hépatique de *Ppara* sous régime TD ainsi que l'expression de plusieurs gènes cibles de *PPAR* $\alpha$  impliqués dans le métabolisme des lipides (Figure 45).

Le régime TD induit une augmentation de l'expression hépatique de *Ppara* dans les souris mâles et femelles à 12 semaines par rapport au régime chow (Figure 45A). Par contre, son expression diminue entre la semaine 12 et 18, montrant une diminution de l'expression hépatique de *Ppara* au cours de la progression de la MASH dans le modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup>. Un effet similaire de diminution d'expression hépatique de *Ppara* a été décrit chez l'Homme au cours de l'évolution de la MASH<sup>232</sup>.

Comparé au régime standard, le régime TD induit une augmentation de l'expression hépatique d'*Aco* et *Bien*, impliqués dans la  $\beta$ -oxydation peroxysomale, dans les souris mâles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mais pas dans les souris femelles (Figure 45B-C), alors que l'expression

hépatique de *Vlcad*, impliqué dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (Figure 45D), est augmentée à la fois dans les mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>. Comme attendu, l'expression de ces gènes cibles de *Ppara* est moins importante dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> déficientes en *Ppara*. Comme observé avec l'expression hépatique de *Ppara*, le régime TD induit une diminution de l'expression de ces gènes entre la semaine 12 et la semaine 18 chez les mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>, probablement lié à la diminution d'expression de PPAR $\alpha$  au cours du temps.

Nous avons également mesuré l'expression hépatique de *Cd36* impliqué dans l'entrée des AG dans le foie (Figure 45E). Comparé au régime chow, le régime TD induit une augmentation d'expression hépatique de *Cd36* à la semaine 12 dans les souris mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>, ce qui est exacerbé à la semaine 18 (Figure 45E). Par contre, la déficience en PPAR $\alpha$  n'induit pas de modification de l'expression hépatique de *Cd36*.

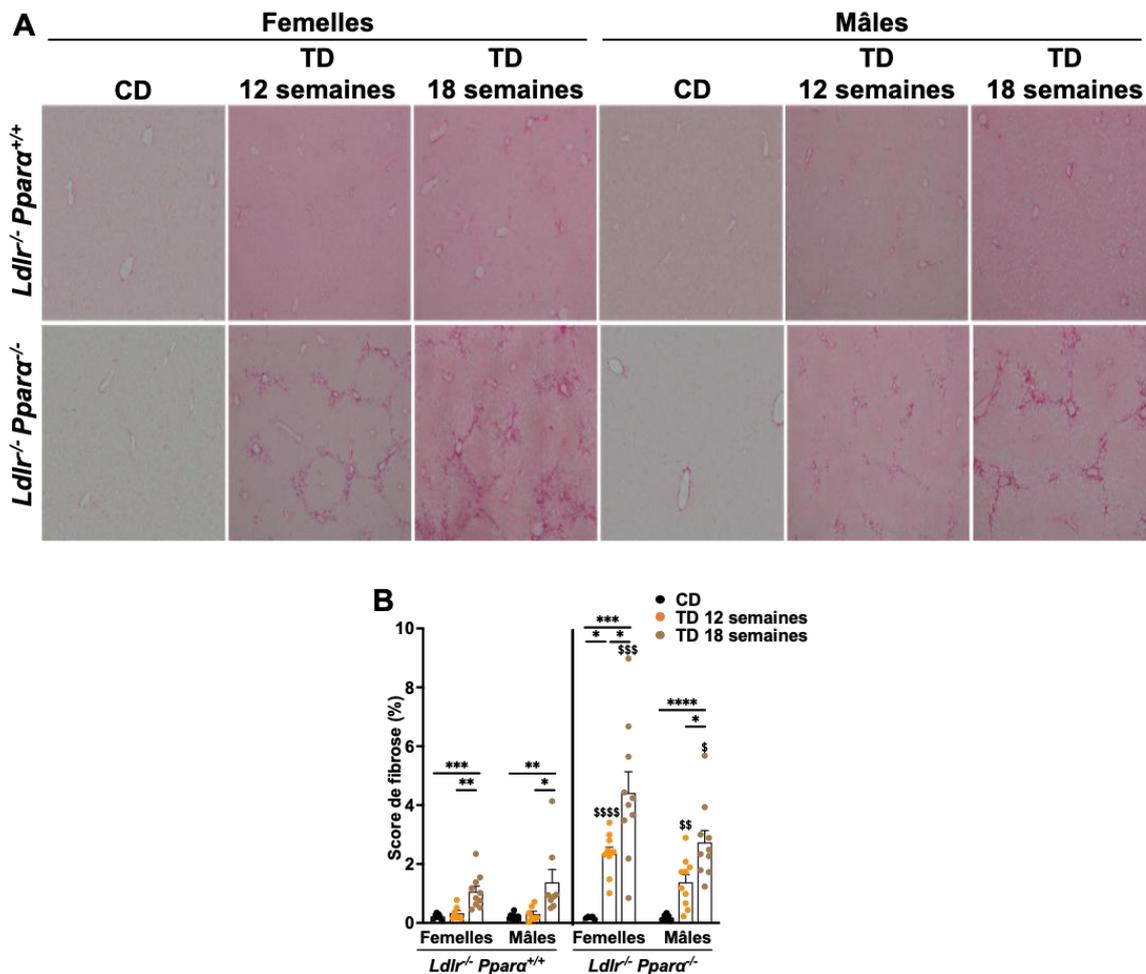


**Figure 45 :** Le régime TD induit l'expression hépatique de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dans les souris mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> déficientes ou non pour PPAR $\alpha$ . Expression génique dans le foie de (A) *Ppara*, (B) *Aco*, (C) *Bien*, (D) *Vlcad*, (E) *Cd36* impliqués dans le métabolisme des lipides mesurée par RT-qPCR. Les souris ont été soumises à un régime standard (CD) ou à un régime TD pendant 12 et 18 semaines. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. (n=4-11 souris/groupe dans le régime CD, n=9-14 souris/groupe dans le régime TD). CD= chow diet. \*effet du régime ; <sup>s</sup>effet génotype. \*ou<sup>s</sup>p<0.05 ; \*\*ou<sup>ss</sup>p<0.01 ; \*\*\*ou<sup>sss</sup>p<0.001 ; \*\*\*\*ou<sup>ssss</sup>p<0.0001.

#### IV. Dimorphisme sexuel et impact de la déficience en PPAR $\alpha$ sur la fibrose hépatique dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> en réponse au régime TD

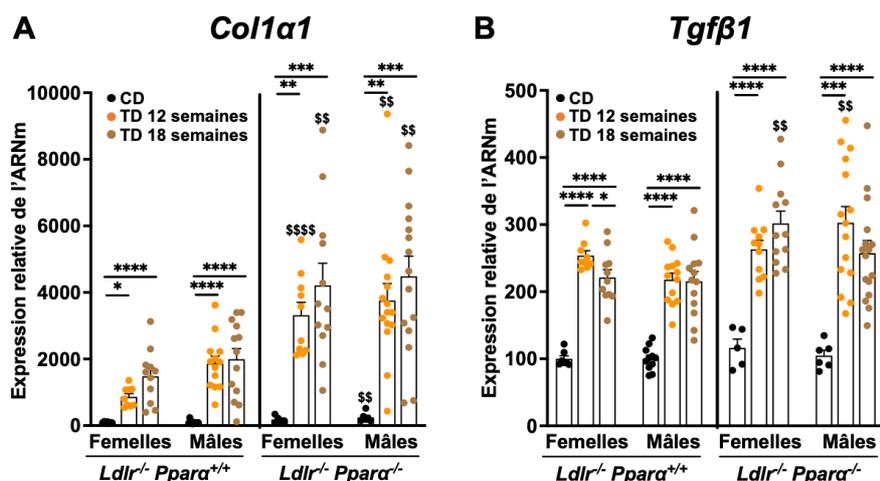
Les analyses histologiques ont été complétées avec l'évaluation de la fibrose hépatique dans les foies de nos souris colorés au rouge Sirius (**Figure 46A-B**).

A 12 semaines de régime TD, aucune fibrose hépatique n'est observable dans les mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mais la déficience en PPAR $\alpha$  induit clairement la présence de fibrose à 12 semaines avec un niveau plus élevé dans les femelles comparées aux mâles (**Figure 46B**). De plus, le régime TD induit une augmentation au cours du temps de la fibrose hépatique entre la semaine 12 et la semaine 18 à la fois dans les souris mâles et femelles. De la même façon qu'à 12 semaines, la déficience en PPAR $\alpha$  aggrave fortement la fibrose hépatique à 18 semaines avec une fibrose plus prononcée dans les souris femelles que dans les mâles.



**Figure 46 : Le régime TD induit de la fibrose hépatique dans les souris mâles et femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> déficientes ou non pour PPAR $\alpha$ . (A) Représentations histologiques des coupes de foie colorées au rouge Sirius (B) Quantification de la surface positive au rouge Sirius. Les souris ont été soumises à un régime standard (CD) ou à un régime TD pendant 12 et 18 semaines. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. (n=4-11 souris/groupe dans le régime CD, n=9-14 souris/groupe dans le régime TD). CD= chow diet. \*effet du régime ; <sup>S</sup>effet génotype. \*ou<sup>S</sup>p<0.05 ; \*\*ou<sup>SS</sup>p<0.01 ; \*\*\*ou<sup>SSS</sup>p<0.001 ; \*\*\*\*ou<sup>SSSS</sup>p<0.0001.**

Les analyses histologiques de fibrose hépatique ont été renforcées par l'analyse de l'expression hépatique de marqueurs de fibrose *Col1α1* et *Tgf-β1* (Figure 47A-B). Le régime TD augmente l'expression hépatique de *Col1α1* et *Tgf-β1* dans les souris mâles et femelles *Ldlr<sup>-/-</sup> Ppara<sup>+/+</sup>* à 12 et 18 semaines par rapport au régime standard. De plus, la déficience en PPARα augmente l'expression hépatique de ces gènes sous régime TD, en lien avec le développement d'une fibrose plus importante dans ces souris.



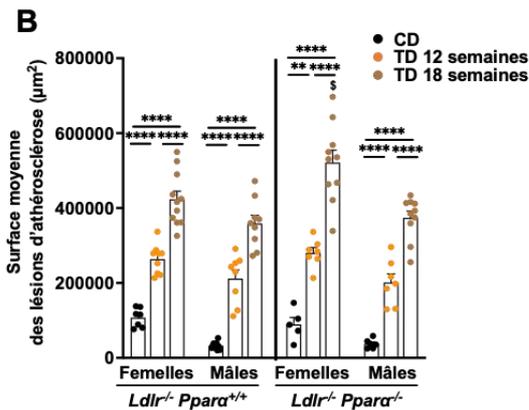
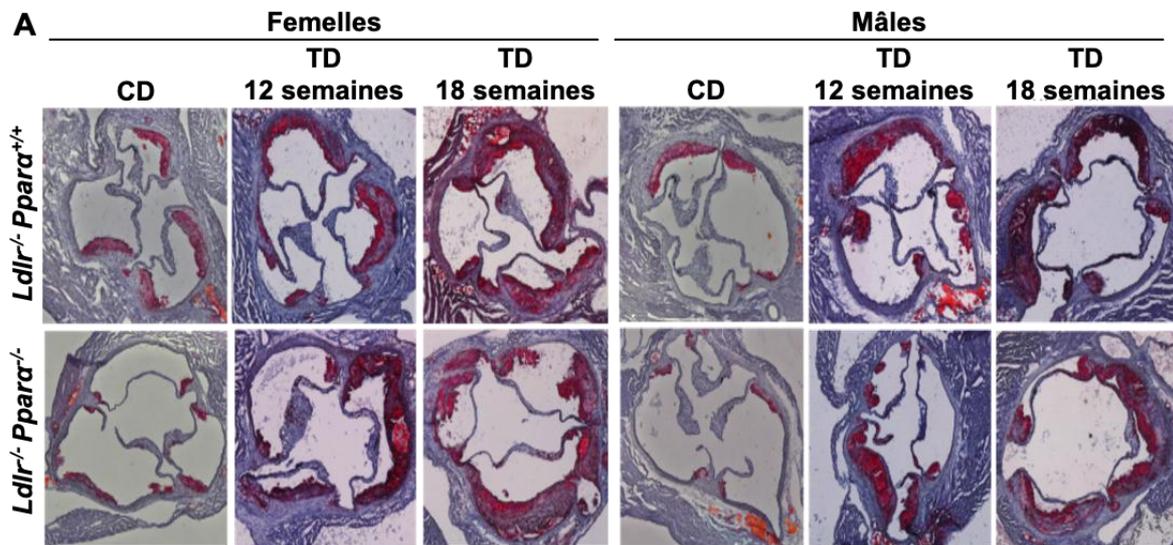
**Figure 47 :** Le régime TD induit l'expression hépatique de gènes impliqués dans la fibrose dans les souris mâles et femelles *Ldlr<sup>-/-</sup>* déficientes ou non pour PPARα. Expression génique dans le foie de (A) *Col1α1* et (B) *Tgfβ1* impliqués dans la fibrose hépatique mesurée par RT-qPCR. Les souris ont été soumises à un régime standard (CD) ou à un régime TD pendant 12 et 18 semaines. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. (n=4-11 souris/groupe dans le régime CD, n=9-14 souris/groupe dans le régime TD). CD= chow diet. \*effet du régime ; §effet génotype. \*p<0.05 ; \*\*ou §§p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 ; \*\*\*\*ou §§§§p<0.0001.

## V. Dimorphisme sexuel et impact de la déficience en PPARα sur le développement de l'athérosclérose dans les souris *Ldlr<sup>-/-</sup>* en réponse au régime TD

Enfin, des analyses histologiques de coupes de cœur au niveau du sinus aortique colorées à l'Oil Red O ont été réalisées afin de déterminer l'impact du dimorphisme sexuel et de la déficience en PPARα sur le développement de l'athérosclérose (Figure 48A-B). La surface moyenne de lésions d'athérosclérose a été quantifiée depuis les pieds de valve jusqu'aux ventricules.

Le régime TD induit le développement de lésions d'athérosclérose à la fois dans les souris mâles et femelles *Ldlr<sup>-/-</sup> Ppara<sup>+/+</sup>* et *Ldlr<sup>-/-</sup> Ppara<sup>-/-</sup>*, et la surface des lésions athérosclérotiques augmente au cours du temps dans tous les groupes. Cependant, un développement de lésions

d'athérosclérose globalement plus important a été observé dans les souris femelles par rapport aux souris mâles. De plus, il est intéressant de noter que la déficience en PPAR $\alpha$  aggrave le développement de l'athérosclérose à 18 semaines uniquement dans les souris femelles.



**Figure 48 :** Le régime TD induit le développement d'athérosclérose dans les souris mâles et femelles Ldlr<sup>-/-</sup> déficientes ou non pour PPAR $\alpha$ . **(A)** Représentations histologiques des coupes de coeur colorées à l'Oil Red O. **(B)** Quantification de la surface des lésions d'athérosclérose à la fin du régime. Les souris ont été soumises à un régime standard (CD) ou à un régime TD pendant 12 et 18 semaines. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. (n=4-11 souris/groupe dans le régime CD, n=9-14 souris/groupe dans le régime TD). CD= chow diet. \*effet du régime ; §effet génotype.  $^{\S}p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .





**DISCUSSION**



**PARTIE 1 : L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE**  
**DU PPAR $\alpha$  HEPATOCYTAIRE EST SUFFISANTE**  
**POUR AMELIORER L'ATHEROSCLEROSE DANS LES SOURIS *Ldlr*<sup>-/-</sup>**

Les fibrates ont longtemps été considérés comme des molécules prometteuses pour la prise en charge du risque résiduel de MCV. Des analyses post-hoc des études FIELD et ACCORD suggèrent que le fenofibrate, seul ou en association avec une statine, réduit le risque de MCV chez des patients avec une dyslipidémie importante (hypertriglycéridémie et faibles concentrations d'HDL-C)<sup>258–260,276–278</sup>. Cependant, plus récemment, dans l'étude PROMINENT, malgré une amélioration de la dyslipidémie, le pemafibrate n'a pas montré d'effets bénéfiques sur le risque d'évènements cardiovasculaires chez des patients diabétiques avec une dyslipidémie et traités par une statine<sup>262</sup>. Comme PPAR $\alpha$  exerce à la fois des effets hypolipémiants et anti-inflammatoires, ces données suggèrent que les fibrates pourraient exercer leur action cardioprotectrice via une amélioration de l'inflammation plutôt que via leur amélioration de la dyslipidémie utilisée pour le recrutement des patients dans l'étude. Dans notre étude, nous avons étudié l'importance des effets anti-inflammatoires versus les effets hypolipémiants de PPAR $\alpha$  activé par le pemafibrate dans un modèle très connu de dyslipidémie mixte et d'athérosclérose, le modèle murin déficient pour le LDLr (*Ldlr*<sup>-/-</sup>) sous régime western pour exagérer la dyslipidémie. Dans un premier temps, nous avons montré que le pemafibrate induit un fort effet athéroprotecteur dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> (-50% de surface de lésions), mais pas dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>. Cet effet est associé à une amélioration de la dyslipidémie athérogène de manière PPAR $\alpha$  dépendante. De ce fait, comme observé au laboratoire dans le modèle de souris *ApoE2K1*<sup>192</sup>, le pemafibrate induit également des effets athéroprotecteurs dans le modèle murin *Ldlr*<sup>-/-</sup>. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études précliniques qui ont déjà montré un effet bénéfique de plusieurs fibrates sur le développement de l'athérosclérose chez la souris<sup>191,233–237</sup>.

Comme le pemafibrate induit une forte athéroprotection dépendante de PPAR $\alpha$  dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>, nous avons ensuite évalué les modifications métaboliques et immunitaires associées à ces effets. Les concentrations plasmatiques de globules blancs et la distribution des différents leucocytes sont inchangées avec le pemafibrate, ce qui indique que le

pemafibrate ne modifie le nombre de globules blancs plasmatiques, y compris les monocytes. PPAR $\alpha$  est exprimé dans beaucoup d'organes métaboliques comme le muscle, le cœur ou l'intestin, et dans plusieurs types cellulaires de la plaque d'athérosclérose. Cependant, PPAR $\alpha$  est très fortement exprimé dans le foie et plus particulièrement les hépatocytes, où il exerce à la fois une activité métabolique et une activité anti-inflammatoire<sup>193–195,279,280</sup>. Nous avons ainsi déterminé le rôle du foie, et plus précisément du PPAR $\alpha$  hépatocytaire dans les effets athéroprotecteurs du pemafibrate. De manière intéressante, nous avons montré que l'activation spécifique du PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> par le pemafibrate dans le foie des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> diminue fortement les concentrations plasmatiques de TG et CT de la même façon que dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> exprimant PPAR $\alpha$  dans l'organisme entier. Ces résultats montrent que le PPAR $\alpha$  hépatocytaire est nécessaire pour induire les effets hypolipémians du pemafibrate. De plus, le pemafibrate réduit fortement le développement de l'athérosclérose dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> de la même manière que dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>. Ces données suggèrent que, bien que PPAR $\alpha$  est exprimé dans beaucoup d'organes et dans des types cellulaires de la plaque d'athérosclérose, le PPAR $\alpha$  hépatocytaire semble être en majorité responsable de l'athéroprotection induite par le pemafibrate dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>. Ces résultats indiquent qu'un organe comme le foie peut jouer un rôle déterminant à distance sur le développement de l'athérosclérose, comme il a déjà été suggéré dans plusieurs études précliniques<sup>281–284</sup>. Cette étude démontre qu'un crosstalk inter-organe entre le foie et le cœur existe et que les hépatocytes jouent un rôle clé dans la médiation des effets athéroprotecteurs du pemafibrate dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>.

Ensuite, nous avons déterminé l'impact de l'activité anti-inflammatoire du PPAR $\alpha$  hépatocytaire via son activité de transrépression sur l'athérogénèse, en utilisant le mutant de PPAR $\alpha$ , le PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>. De manière surprenante, dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>, le pemafibrate diminue le développement de l'athérosclérose de la même façon que dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> (-42%) malgré l'absence d'amélioration de la dyslipidémie athérogène. L'activité anti-inflammatoire du PPAR $\alpha$  hépatocytaire est suffisante pour induire les effets athéroprotecteurs du pemafibrate dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>. Ces résultats sont en accord avec les observations qui montrent que l'inflammation est impliquée dans les premières étapes de l'athérogénèse<sup>285</sup>, et que des concentrations élevées de cytokines inflammatoires sont associées avec un risque élevé de MCV<sup>286</sup>. Le pemafibrate exerce donc son action athéroprotectrice via l'activation de

la transrépression du PPAR $\alpha$  hépatocytaire, ce qui conduit à une diminution de l'inflammation hépatique comme indiqué par la réduction du nombre de cellules CD68-positives dans le foie, et à une diminution de la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. De manière intéressante, les analyses de snRNA-seq réalisées sur le foie des souris reconstituées avec un AAV8 ont montré une diminution significative du pourcentage de cellules myéloïdes dans le foie des souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> traitées avec le pemafibrate. A cet effet était également associée une inhibition par le pemafibrate d'un phénotype pro-inflammatoire dans les hépatocytes. L'existence d'un phénotype pro-inflammatoire dans les hépatocytes régulant la réponse immunitaire a déjà été décrit dans un contexte d'endotoxémie induite par du LPS<sup>287</sup>. En limitant le nombre d'hépatocytes pro-inflammatoires, le pemafibrate, via l'activité de transrépression du PPAR $\alpha$ , réduit le recrutement et l'activation des leucocytes dans le foie et plus particulièrement des LAM, des macrophages inflammatoires dérivés de monocytes et des neutrophiles qui jouent tous un rôle dans l'inflammation hépatique<sup>288</sup>. Ces résultats conduisent à une diminution de l'expression de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ . Il est important de noter que nous sommes intéressés aux interactions spécifiques entre les hépatocytes, les cellules myéloïdes et les neutrophiles mais d'autres interactions intercellulaires au sein du foie peuvent jouer un rôle important dans l'inflammation hépatique<sup>288-290</sup>. De manière intéressante, les concentrations plasmatiques d'IL-1 $\beta$  sont également diminuées par le pemafibrate dans les souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> et souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> traitées avec le pemafibrate. IL-1 $\beta$  est un puissant stimulateur de l'expression de VCAM-1 dans les lésions d'athérosclérose<sup>291</sup>. Étant donné que les cellules VCAM-1- et MOMA-2-positives sont réduites dans la plaque d'athérosclérose des souris AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> et AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> traitées par le pemafibrate, nous avons supposé que ce dernier, via l'activité transrépressive de PPAR $\alpha$ , diminue l'inflammation hépatique en réduisant le nombre d'hépatocytes pro-inflammatoires et en inhibant le recrutement et l'activation des leucocytes. Cela entraîne une baisse des niveaux plasmatiques d'IL-1 $\beta$  et limite le recrutement des monocytes via VCAM-1, réduisant ainsi les macrophages intraplaques et le développement de l'athérosclérose (**Figure 49**). L'importance de la prise en charge de l'inflammation pour diminuer le risque de MCV indépendamment de la dyslipidémie a déjà été démontré dans l'étude CANTOS dans laquelle le canakinumab, un anticorps monoclonal dirigé contre l'IL-1 $\beta$ , diminue le nombre d'évènements cardiovasculaire indépendamment d'un effet

hypolipémiant<sup>168</sup>. De plus, les études cliniques utilisant la colchicine, un puissant anti-inflammatoire, ont montré son effet bénéfique sur la prévention du risque cardiovasculaire<sup>165-167</sup>. Elle est d'ailleurs autorisée au Canada pour diminuer le risque de MCV. De plus, d'autres études cliniques utilisant des antagonistes NLRP3 ou des inhibiteurs de l'IL-6 sont actuellement en cours d'évaluation<sup>169,292-294</sup>. Ces données montrent que les nouvelles thérapies ciblant l'inflammation sont prometteuses pour prendre en charge le risque de MCV.

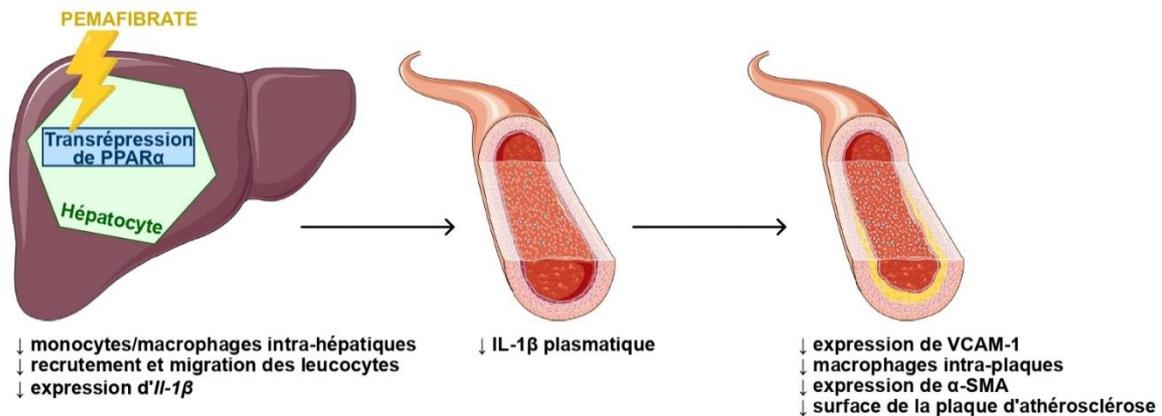
Les résultats de notre étude et d'autres<sup>164,262,295</sup> amènent à s'interroger sur la pertinence de la prise en charge de la dyslipidémie et plus spécifiquement des TG et des remnants de cholestérol, dans la prévention du risque résiduel de MCV chez des patients traités avec une statine, comme dans l'étude PROMINENT. La réduction des concentrations de LDL-C reste la base de la prise en charge du risque de MCV et le traitement hypolipémiant par statine reste l'un des traitements les plus couramment utilisés et les plus efficaces pour réduire le risque de MCV<sup>272,296</sup>. Bien que plusieurs études suggèrent que la prise en charge des TG et des remnants de cholestérol diminue le risque résiduel de MCV<sup>273</sup>, les résultats de notre étude chez la souris et de l'essai PROMINENT chez l'Homme suggèrent que ce n'est peut-être pas forcément le cas. De la même façon, les effets cardioprotecteurs de l'EPA, un AG polyinsaturé avec des effets hypotriglycéridémians, semblent être indépendants des taux plasmatiques de TG de base ou de la diminution des TG dans l'étude REDUCE-IT<sup>295,297</sup>. Les propriétés anti-inflammatoires de l'EPA semblent jouer un rôle important dans ses effets cardioprotecteurs<sup>298,299</sup>. Malheureusement, nous n'avons pas pu déterminer l'effet de l'activité hypolipémiante de PPAR $\alpha$  sur le développement de l'athérosclérose indépendamment de son activité anti-inflammatoire dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>, car un mutant de PPAR $\alpha$  exerçant uniquement une activité de transactivation de PPAR $\alpha$  n'a pas encore été identifié.

Enfin, même si la plaque d'athérosclérose chez la souris est utilisée comme un marqueur pour les événements cardiovasculaires (tels qu'évalués dans les essais cliniques comme PROMINENT), les résultats de notre étude soulignent l'importance de l'activité anti-inflammatoire du PPAR $\alpha$  hépatique dans les effets cardioprotecteurs du pemafibrate, et nous permettent de proposer certaines hypothèses à l'origine de l'échec de l'essai PROMINENT. En effet, la sélection de patients présentant un risque inflammatoire résiduel élevé pourrait permettre d'optimiser les effets cardioprotecteurs des agonistes PPAR $\alpha$  dans les études cliniques. De plus, il serait intéressant d'évaluer les effets du pemafibrate sur certains

paramètres inflammatoires dans l'étude PROMINENT pour déterminer sa capacité à activer la transrépression de PPAR $\alpha$  chez l'Homme. De manière plus générale, les effets anti-inflammatoires des fibrates liés à la transrépression de PPAR $\alpha$  ne sont pas pris en compte dans les études cliniques évaluant leurs effets sur les MCV. Ces observations sont d'autant plus intéressantes qu'une analyse récente sur plus de 30 000 patients des études PROMINENT, REDUCE-IT et STRENGTH, a montré que l'inflammation (mesurée par les concentrations plasmatiques de CRP), mais pas le LDL-C, est un prédicteur d'évènements cardiovasculaires chez les patients recrutés dans ces études et traités avec une statine (concentrations basales de LDL-C comprises entre 70 et 80 mg/dL)<sup>164</sup>. Il est bien connu qu'il existe des différences en termes de spécificité, de puissance et de sélectivité pour PPAR $\alpha$  ainsi que dans le recrutement de cofacteurs hépatiques entre la souris et l'Homme, et également entre les différents fibrates<sup>300-302</sup>. Ces différences peuvent se traduire par des réponses biologiques distinctes notamment sur les propriétés anti-inflammatoires. Ensuite, l'expression de PPAR $\alpha$  dans le foie des patients de PROMINENT n'est peut-être pas suffisante pour que le pemafibrate exerce ses propriétés anti-inflammatoires. En effet, précédemment, notre laboratoire a montré dans des souris ApoE2KI que les niveaux d'expression du gène *Ppara* affectent différemment la réponse aux fibrates sur le métabolisme des lipides hépatiques, l'inflammation et l'athérosclérose<sup>191</sup>. Un seul allèle *Ppara* est suffisant pour obtenir une réponse optimale du fenofibrate sur le métabolisme des lipides alors que les deux allèles sont nécessaires pour obtenir le maximum de ses effets anti-inflammatoires dans le foie et le maximum de ses effets athéroprotecteurs. Des patients avec du diabète de type 2 et un IMC très élevé ont été recrutés dans l'étude PROMINENT. Cependant, les patients avec ces pathologies présentent une prévalence très élevée de MASLD et de MASH<sup>18</sup>, et il est connu que les niveaux d'expression hépatique de PPAR $\alpha$  sont diminués dans les patients MASLD<sup>232</sup>. Nous avons donc émis l'hypothèse que les patients diabétiques dans l'étude PROMINENT présentent une faible expression hépatique de PPAR $\alpha$ , ce qui se traduit par une induction plus faible de l'activité transrépressive de PPAR $\alpha$  par le pemafibrate et un impact plus faible sur l'inflammation. Dans notre étude, les souris ont été soumises à un régime western qui induit une atteinte hépatique modérée avec une stéatose bénigne et une inflammation légère, sans MASH avérée<sup>182</sup>. Il serait intéressant d'évaluer si le pemafibrate exerce ses effets athéroprotecteurs dans un contexte d'atteinte hépatique plus sévère. Enfin, il a été démontré que les statines exercent une activité anti-

inflammatoire via PPAR $\alpha$ <sup>303,304</sup>. Comme les patients PROMINENT sont déjà traités avec une statine, il est possible que PPAR $\alpha$  soit pleinement engagé dans les effets anti-inflammatoires des statines, ce qui exclut toute autre propriété anti-inflammatoire et cardioprotectrice du pemafibrate.

En conclusion, nos résultats démontrent que l'amélioration de l'inflammation hépatique via l'activité transrépressive de PPAR $\alpha$  est suffisante pour induire les effets athéroprotecteurs du pemafibrate dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>. Ces observations suggèrent que des mécanismes autres que la réduction des lipides sont nécessaires pour la prise en charge du risque résiduel de MCV et supportent le développement de molécules ciblant l'inflammation dans la gestion du risque de MCV.



**Figure 49 :** Effet de l'activation hépato-spécifique de l'activité transrépressive de PPAR $\alpha$  par le pemafibrate sur le développement de l'athérosclérose. L'activation de l'activité transrépressive de PPAR $\alpha$  dans les hépatocytes par le pemafibrate diminue le recrutement et l'activation des leucocytes hépatiques, limite la production et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  dans le sang et réduit l'expression de VCAM-1 et d' $\alpha$ -SMA au niveau de la plaque, ce qui diminue le nombre de macrophages dans la plaque et ainsi la surface des lésions d'athérosclérose.

## **PARTIE 2 : DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU MODELE MURIN** **PERTINENT DE MASLD ET D'ATHEROSCLEROSE**

La MASLD est une maladie complexe et multifactorielle qui impliquent plusieurs organes et dont les mécanismes sous-jacents demeurent mal compris. En raison de sa prévalence croissante, elle est devenue un véritable enjeu de santé publique. De nombreux modèles précliniques, principalement chez la souris, ont été développés pour étudier la pathophysiologie de la MASLD et élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cependant, ces modèles, basés sur des régimes alimentaires spécifiques, des manipulations génétiques ou l'utilisation d'agents chimiques, ne parviennent pas à reproduire l'ensemble du spectre de la MASLD ni les altérations métaboliques observées chez l'Homme. Ils ne miment que certaines caractéristiques spécifiques de la maladie. C'est pourquoi il est crucial de développer des modèles qui reflètent de manière plus fidèle l'alimentation, la physiologie et la progression de la MASLD/MASH humaine.

De plus, les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité chez les patients atteints de MASLD, mais les mécanismes en cause restent non élucidés par manque de modèles précliniques adaptés. En effet, peu de modèles existent associant à la fois un développement de MASLD présentant toutes les caractéristiques humaines et un développement de lésions d'athérosclérose sur un temps relativement court.

Dans cette optique, nous avons utilisé le modèle de souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> largement employé dans les études d'athérosclérose, et nous avons mis au point un nouveau modèle progressif de MASLD/MASH et d'athérosclérose en soumettant ces souris à un régime alimentaire TD riche en graisses et en cholestérol sur une période relativement courte de 12 à 18 semaines. Contrairement aux études antérieures qui montrent que la MASH avec fibrose induite par un régime riche en graisse se développe généralement sur une période longue pouvant aller jusqu'à un an<sup>305-308</sup>, notre modèle permet une progression plutôt rapide de la pathologie, tout en reproduisant fidèlement les principales caractéristiques morphologiques de la MASLD humaine. En effet, les analyses histologiques du foie de ces souris révèlent une stéatose sévère, une inflammation marquée, un important ballooning des hépatocytes et une fibrose avancée. La majorité des modèles murins décrits dans la littérature ne parviennent pas à

reproduire les principales caractéristiques morphologiques de la MASH, en particulier le ballooning des hépatocytes<sup>172</sup>. De plus, la définition de ce dernier demeure relativement floue, ce qui complique parfois son évaluation. Dans notre modèle, l'histologie du foie montre clairement la présence de ballooning, avec des hépatocytes présentant un cytoplasme réticulé rose pâle, une forme arrondie, et parfois un diamètre deux fois supérieur à celui des hépatocytes sains, conformément à la description faite par Bedossa<sup>34</sup>. Nous avons également observé que, dans les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> sous régime TD, l'expression hépatique de *Ppara* diminue progressivement entre la 12<sup>ème</sup> et la 18<sup>ème</sup> semaine. Ces résultats sont particulièrement intéressants puisqu'ils sont en accord avec une étude conduite chez l'Homme qui a montré que l'expression hépatique de *Ppara* diminue au cours de la progression de la MASH et qu'elle réaugmente avec l'amélioration histologique du foie<sup>232</sup>. Ces caractéristiques histologiques observées au niveau du foie des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> sous régime TD sont associées à la présence de facteurs cardiométaboliques classiques, tels que l'obésité, la résistance à l'insuline et la dyslipidémie. Ces résultats suggèrent que le régime TD peut induire une véritable MASH au niveau du foie des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> avec toutes les caractéristiques humaines, y compris le ballooning, la fibrose et la diminution de l'expression de *Ppara*, mais il ne se limite pas à une simple atteinte hépatique et induit également d'autres caractéristiques systémiques classiquement observées chez les patients MASH. Ce modèle peut ainsi nous permettre d'étudier et mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la MASH puisqu'il induit cette pathologie de manière physiologique avec toutes les caractéristiques morphologiques humaines et dans un contexte de syndrome métabolique (Tableau 11).

Nombre de semaines de régime TD	Obésité		IR		Plasma CT		Stéatose hépatique		Inflammation hépatique		Ballooning des hépatocytes		NAS		Fibrose hépatique		Athérosclérose	
	12	18	12	18	12	18	12	18	12	18	12	18	12	18	12	18	12	18
<i>Ldlr</i> <sup>-/-</sup> / <i>Ppara</i> <sup>+/-</sup> ♀	-	-	-	-	+++	++	++	+++	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	++	+++
<i>Ldlr</i> <sup>-/-</sup> / <i>Ppara</i> <sup>+/-</sup> ♂	+++	++++	+++	++++	++++	++++	+++	++++	+	+++	+++	+++	++	+++	+/-	+	+	++
<i>Ldlr</i> <sup>-/-</sup> / <i>Ppara</i> <sup>-/-</sup> ♀	-	-	-	-	+++	++	++	+++	+++	++++	+/-	++	++	+++	++	+++	++	++++
<i>Ldlr</i> <sup>-/-</sup> / <i>Ppara</i> <sup>-/-</sup> ♂	-	-	-	-	+++	+++	+++	++++	+++	++++	+++	++++	+++	++++	+	++	+	++

**Tableau 11 : Tableau récapitulatif des caractéristiques induites par le régime TD dans le modèle de souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>.** (-) = absent, (+/-) = très peu présent, (+) = présent, (++) = très présent, (+++) et (++++) = fortement présent. IR = Résistance à l'insuline, CT = Cholestérol total, NAS : NAFLD Activity Score.

Il est intéressant de noter que la déficience en PPAR $\alpha$  semble jouer un rôle ambigu dans ce modèle sur certaines composantes du syndrome métabolique et sur la MASLD. Dans un premier temps, nous avons montré que la déficience en PPAR $\alpha$  semble être protectrice contre l'obésité et la résistance à l'insuline induite par le régime TD. Ces résultats surprenants sont en accord avec une étude antérieure où des souris *Ppara*<sup>-/-</sup> soumises à un régime riche en graisses ont montré un poids corporel, une glycémie et une insulïnémie inférieurs par rapport aux souris sauvages<sup>309</sup>. Ces résultats suggèrent que PPAR $\alpha$  joue un rôle important dans le développement de certains paramètres du syndrome métabolique tels que l'obésité et l'insulinorésistance et peut être délétère en cas de stress métabolique induit par un régime riche en graisse. Cependant, ces observations sont controversées par plusieurs études qui ont montré que l'activation de PPAR $\alpha$  par un fibrate semble avoir un effet protecteur contre l'obésité et la résistance à l'insuline, et l'impact de la déficience en PPAR $\alpha$  semble dépendre du modèle génétique utilisé<sup>310-312</sup>, ce qui souligne la nécessité de mener davantage d'études afin de mieux comprendre le rôle de PPAR $\alpha$  dans le syndrome métabolique. Dans un second temps, la déficience en PPAR $\alpha$  a considérablement augmenté la susceptibilité au développement de la MASH dans notre modèle de souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>. Ces observations confirment plusieurs études montrant que les souris *Ppara*<sup>-/-</sup> développent une MASLD plus prononcée comparée aux souris sauvages<sup>219,217,271</sup>. De plus, la déficience en PPAR $\alpha$  spécifiquement dans les hépatocytes aggrave la stéatose et l'inflammation hépatique dans des souris soumises à un régime riche en graisses, suggérant que PPAR $\alpha$ , en particulier dans les hépatocytes, constitue une cible thérapeutique pertinente dans la prévention de la MASLD<sup>180-182</sup>. Plus précisément, dans le développement de la MASH, la déficience en PPAR $\alpha$  aggrave le score de ballooning dans les souris mâles et femelles, et augmente le score d'inflammation et de fibrose uniquement dans les souris femelles. Elle n'a toutefois aucun impact sur le score de stéatose. Ces résultats suggèrent que la déficience en PPAR $\alpha$  favorise le développement de la MASH en aggravant principalement le ballooning et l'inflammation ainsi que la fibrose. De plus, une étude précédemment menée au laboratoire a déjà démontré que l'activité transrépressive de PPAR $\alpha$  est nécessaire et suffisante pour améliorer l'inflammation hépatique, la fibrose et freiner la progression de la MASH<sup>179</sup>. Ces données suggèrent que cette aggravation pourrait être liée à une absence d'activité transrépressive de PPAR $\alpha$  et de ses effets anti-inflammatoires.

De plus, la déficience en PPAR $\alpha$  induit également une aggravation de la surface des lésions d'athérosclérose induite par le régime TD dans notre modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup>. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont montré que, dans plusieurs modèles génétiques, la déficience en PPAR $\alpha$  entraîne une augmentation de la surface des lésions d'athérosclérose, soulignant le rôle de PPAR $\alpha$  dans la pathogénèse de l'athérosclérose<sup>313,314</sup>.

Enfin, le développement de notre modèle murin a également mis en évidence l'existence d'un dimorphisme sexuel dans la progression de la MASLD et de l'athérosclérose. En effet, comme observé chez l'Homme avant la ménopause<sup>315</sup> et dans d'autres études chez la souris<sup>182</sup>, les souris mâles *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumis au régime TD sont plus susceptibles de développer de l'obésité, de la résistance à l'insuline et de la MASLD par rapport aux souris femelles. Ces différences sont probablement attribuées aux effets protecteurs connus des œstrogènes. Nous avons également constaté que ce dimorphisme sexuel s'entrecroise avec la déficience en PPAR $\alpha$ . En effet, les souris femelles déficientes pour PPAR $\alpha$  présentent une augmentation marquée de l'inflammation et de la fibrose hépatique, ainsi qu'une progression plus importante de l'athérosclérose par rapport aux mâles et aux souris sauvages. Ces résultats peuvent s'expliquer par le rôle anti-inflammatoire et anti-fibrotique des œstrogènes, et par la contribution de PPAR $\alpha$  à cette activité via une interaction avec le récepteur aux œstrogènes<sup>316</sup>. La déficience en PPAR $\alpha$  pourrait ainsi altérer les effets anti-inflammatoires des œstrogènes. Ces résultats s'inscrivent dans la continuité d'une étude antérieure menée chez la souris, qui a également montré que la déficience en PPAR $\alpha$  conduit à une inflammation et à une fibrose hépatique plus marquées chez les femelles<sup>182</sup>, renforçant l'idée que PPAR $\alpha$  est une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la MASLD influencée par des facteurs liés au sexe.

Comme pour le développement de la MASH, nous avons également un dimorphisme sexuel dans la progression de l'athérosclérose. Dans ce cas, les souris femelles *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises au régime TD développent davantage de lésions d'athérosclérose que les souris mâles. Ces différences ont déjà été observées auparavant dans le modèle *Ldlr*<sup>-/-</sup> et il est très bien décrit que les souris femelles développent plus de lésions d'athérosclérose que les souris mâles<sup>317</sup>. Bien que d'autres études supplémentaires plus approfondies soient nécessaires, ces résultats divergents suggèrent que l'athérosclérose pourrait ne pas être directement causée par la MASH *per se*, mais plutôt par l'une de ses composantes spécifiques, ce qui ouvre de nouvelles

perspectives pour comprendre les mécanismes sous-jacents reliant ces deux pathologies. En effet, l'aggravation concomitante de l'inflammation et de la fibrose hépatique ainsi que de la surface des lésions d'athérosclérose dans les souris femelles *Ldlr<sup>-/-</sup> Ppara<sup>-/-</sup>* suggère un lien potentiel entre ces trois facteurs. Cela nous permet d'émettre une hypothèse préliminaire selon laquelle l'inflammation et la fibrose hépatique, plutôt que la MASH elle-même avec toutes ces caractéristiques, pourraient jouer un rôle déterminant dans le développement de l'athérosclérose. Il est d'ailleurs déjà suggéré que la fibrose hépatique augmente le risque de MCV<sup>19</sup>. Par exemple, il a déjà été montré que, alors que la MASLD ne prédit pas la mortalité cardiovasculaire, des scores de fibrose tels que le NFS et le FIB-4 prédisent fortement la mortalité cardiovasculaire dans la population générale<sup>318</sup>. Cette hypothèse ouvre ainsi la voie à une exploration plus approfondie de leurs interactions et de leur rôle dans la progression de ces pathologies.

En conclusion, notre étude nous a permis d'élaborer un nouveau modèle murin de MASLD et d'athérosclérose induit par un régime dans le fond *Ldlr<sup>-/-</sup>* sur un temps relativement court (12-18 semaines), qui mime fidèlement les caractéristiques humaines de la MASLD et de la MASH (à savoir la triade stéatose-inflammation-ballooning, avec également la présence de fibrose) et qui est capable de développer progressivement de l'athérosclérose. Les résultats suggèrent un rôle clé de la déficience en PPAR $\alpha$  et soulignent l'importance de considérer les différences liées au sexe dans l'étude de la MASLD et de l'athérosclérose. Ce modèle pourra être utilisé pour tester de futures molécules d'intérêt dans la prise en charge de la MASH, offrant ainsi des opportunités pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Enfin, notre hypothèse préliminaire sur le lien entre inflammation et athérosclérose, que l'on retrouve également dans la première partie de cette thèse, ouvre de nouvelles perspectives pour explorer les mécanismes sous-jacents. Ces investigations pourront être réalisées avec notre nouveau modèle murin qui semble idéal pour étudier ces interactions complexes. En somme, ceci ouvre la voie à des investigations futures visant à mieux comprendre la pathophysiologie de la MASLD et ses conséquences sur le risque cardiovasculaire, et à développer des traitements plus adaptés, ce qui est crucial compte tenu de la prévalence croissante de cette maladie dans la population mondiale.





**CONCLUSION**



Ma thèse a permis d'approfondir notre compréhension des relations complexes entre la MASLD et l'athérosclérose, tout en mettant en avant le rôle central de PPAR $\alpha$  dans ces pathologies. Nos résultats soulignent l'importance de l'inflammation, notamment hépatique, dans la progression de l'athérosclérose. Bien que les fibrates sont clairement utilisés pour améliorer le profil lipidique, notre étude révèle pour la première fois que le contrôle de l'inflammation hépatique par le pemafibrate via l'activité transrépressive de PPAR $\alpha$  est suffisant pour agir de manière distale sur le risque cardiovasculaire en diminuant le développement de la plaque d'athérosclérose. Ce constat s'inscrit dans une perspective plus large suggérant que les traitements visant à cibler l'inflammation pourraient offrir une stratégie efficace pour gérer le risque résiduel de MCV chez les patients, au-delà des approches traditionnelles basées sur la réduction des lipides.

L'évolution des traitements hypolipémiants utilisés pour réduire le risque cardiovasculaire a d'ailleurs fait l'objet d'une revue que j'ai écrite au cours de ma thèse et qui s'intitule « *Historical overview of the evolution of lipid-lowering drugs used in the management of cardiovascular risk* » (**Annexe 3**).

De plus, le modèle murin que nous avons développé dans le fond *Ldlr*<sup>-/-</sup> reproduit fidèlement les caractéristiques humaines de la MASLD, y compris la stéatose, l'inflammation et le ballooning des hépatocytes avec présence de fibrose, et y associe un développement progressif d'athérosclérose sur un temps relativement court. Ce modèle murin nous permettra une exploration plus précise des mécanismes pathologiques de la MASLD et de ses complications cardiovasculaires telles que l'athérosclérose, tout en prenant en compte le rôle clé du dimorphisme sexuel dans le développement de ces pathologies.

Ces travaux ouvrent la voie à de futures études qui mèneraient au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour gérer la MASLD, un enjeu de santé publique croissant. Une meilleure compréhension des interactions complexes entre l'inflammation, la fibrose hépatique et l'athérosclérose pourrait ainsi contribuer au développement de traitements plus ciblés et efficaces afin de limiter le risque de MCV chez les patients atteints de MASLD.





**REFERENCES**



1. Trefts, E., Gannon, M. & Wasserman, D. H. The liver. *Curr Biol* **27**, R1147–R1151 (2017).
2. Haschek, W. M., Rousseaux, C. G. & Wallig, M. A. Chapter 9 - The Liver. in *Fundamentals of Toxicologic Pathology (Second Edition)* (eds. Haschek, W. M., Rousseaux, C. G. & Wallig, M. A.) 197–235 (Academic Press, San Diego, 2010). doi:10.1016/B978-0-12-370469-6.00009-X.
3. Cheng, M. L., Nakib, D., Perciani, C. T. & MacParland, S. A. The immune niche of the liver. *Clin Sci (Lond)* **135**, 2445–2466 (2021).
4. Feingold, K. R. Introduction to Lipids and Lipoproteins. in *Endotext* (eds. Feingold, K. R. et al.) (MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA), 2000).
5. Rui, L. Energy Metabolism in the Liver. *Compr Physiol* **4**, 177–197 (2014).
6. Mashek, D. G. Hepatic lipid droplets: A balancing act between energy storage and metabolic dysfunction in NAFLD. *Molecular Metabolism* **50**, 101115 (2021).
7. Li, H., Yu, X.-H., Ou, X., Ouyang, X.-P. & Tang, C.-K. Hepatic cholesterol transport and its role in non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *Prog Lipid Res* **83**, 101109 (2021).
8. Chiang, J. Y. L., Ferrell, J. M., Wu, Y. & Boehme, S. Bile Acid and Cholesterol Metabolism in Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Therapy. *Cardiol Plus* **5**, 159–170 (2020).
9. Grant, D. M. Detoxification pathways in the liver. *J Inherit Metab Dis* **14**, 421–430 (1991).
10. Cohen, D. E. & Fisher, E. A. Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* **33**, 380–388 (2013).
11. Kamstrup, P. R., Benn, M., Tybjaerg-Hansen, A. & Nordestgaard, B. G. Extreme lipoprotein(a) levels and risk of myocardial infarction in the general population: the Copenhagen City Heart Study. *Circulation* **117**, 176–184 (2008).
12. Kamstrup, P. R., Tybjaerg-Hansen, A., Steffensen, R. & Nordestgaard, B. G. Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA* **301**, 2331–2339 (2009).
13. Nordestgaard, B. G. *et al.* Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J* **31**, 2844–2853 (2010).
14. Hogarth, C. A., Roy, A. & Ebert, D. L. Genomic evidence for the absence of a functional cholesteryl ester transfer protein gene in mice and rats. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **135**, 219–229 (2003).

15. Teng, B. B. *et al.* Mutational analysis of apolipoprotein B mRNA editing enzyme (APOBEC1). structure-function relationships of RNA editing and dimerization. *J Lipid Res* **40**, 623–635 (1999).
16. Rinella, M. E. *et al.* A multi-society Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *J Hepatol* S0168-8278(23)00418-X (2023) doi:10.1016/j.jhep.2023.06.003.
17. Younossi, Z. M. & Henry, L. Understanding the Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Time for Action. *Diabetes Spectr* **37**, 9–19 (2024).
18. Miao, L., Targher, G., Byrne, C. D., Cao, Y.-Y. & Zheng, M.-H. Current status and future trends of the global burden of MASLD. *Trends Endocrinol Metab* **35**, 697–707 (2024).
19. Targher, G., Byrne, C. D. & Tilg, H. MASLD: a systemic metabolic disorder with cardiovascular and malignant complications. *Gut* **73**, 691–702 (2024).
20. Romeo, S. *et al.* Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* **40**, 1461–1465 (2008).
21. Kozlitina, J. *et al.* Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* **46**, 352–356 (2014).
22. Chalasani, N. *et al.* Genome-wide association study identifies variants associated with histologic features of nonalcoholic Fatty liver disease. *Gastroenterology* **139**, 1567–1576, 1576.e1–6 (2010).
23. Mancina, R. M. *et al.* The MBOAT7-TMC4 Variant rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent. *Gastroenterology* **150**, 1219-1230.e6 (2016).
24. Day, C. P. & James, O. F. Steatohepatitis: a tale of two ‘hits’? *Gastroenterology* **114**, 842–845 (1998).
25. Friedman, S. L., Neuschwander-Tetri, B. A., Rinella, M. & Sanyal, A. J. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* **24**, 908–922 (2018).
26. Postic, C. & Girard, J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab* **34**, 643–648 (2008).
27. Yin, X., Guo, X., Liu, Z. & Wang, J. Advances in the Diagnosis and Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* **24**, 2844 (2023).

28. Li, Y. *et al.* Updated mechanisms of MASLD pathogenesis. *Lipids Health Dis* **23**, 117 (2024).
29. Delli Bovi, A. P. *et al.* Oxidative Stress in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. An Updated Mini Review. *Front Med (Lausanne)* **8**, 595371 (2021).
30. Lebeaupin, C. *et al.* Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* **69**, 927–947 (2018).
31. Leung, C., Rivera, L., Furness, J. B. & Angus, P. W. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**, 412–425 (2016).
32. Brunt, E. M., Janney, C. G., Di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A. & Bacon, B. R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* **94**, 2467–2474 (1999).
33. Kleiner, D. E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**, 1313–1321 (2005).
34. Bedossa, P. *et al.* Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* **56**, 1751–1759 (2012).
35. Li, G. *et al.* Non-invasive tests of non-alcoholic fatty liver disease. *Chin Med J (Engl)* **135**, 532–546 (2022).
36. European Association for the Study of the Liver (EASL). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines on the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). *J Hepatol* **81**, 492–542 (2024).
37. Kimura, T. *et al.* Serum thrombospondin 2 is a novel predictor for the severity in the patients with NAFLD. *Liver Int* **41**, 505–514 (2021).
38. Kozumi, K. *et al.* Transcriptomics Identify Thrombospondin-2 as a Biomarker for NASH and Advanced Liver Fibrosis. *Hepatology* **74**, 2452–2466 (2021).
39. Lee, C.-H. *et al.* Circulating Thrombospondin-2 as a Novel Fibrosis Biomarker of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **44**, 2089–2097 (2021).
40. Vilar-Gomez, E. & Chalasani, N. Non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease: Clinical prediction rules and blood-based biomarkers. *J Hepatol* **68**, 305–315 (2018).
41. Sandrin, L. *et al.* Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* **29**, 1705–1713 (2003).

42. Vilar-Gomez, E. *et al.* Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **149**, 367-378.e5; quiz e14-15 (2015).
43. Lassailly, G. *et al.* Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology* **149**, 379–388; quiz e15-16 (2015).
44. Caiazzo, R. *et al.* Roux-en-Y gastric bypass versus adjustable gastric banding to reduce nonalcoholic fatty liver disease: a 5-year controlled longitudinal study. *Ann Surg* **260**, 893–898; discussion 898-899 (2014).
45. Nickel, F. *et al.* Bariatric Surgery as an Efficient Treatment for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in a Prospective Study with 1-Year Follow-up : BariScan Study. *Obes Surg* **28**, 1342–1350 (2018).
46. Sato-Espinoza, K., Chotiprasidhi, P., Huaman, M. R. & Díaz-Ferrer, J. Update in lean metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *World J Hepatol* **16**, 452–464 (2024).
47. Scorletti, E. *et al.* Dietary Vitamin E Intake Is Associated With a Reduced Risk of Developing Digestive Diseases and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Gastroenterol* **117**, 927–930 (2022).
48. Sanyal, A. J. *et al.* Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* **362**, 1675–1685 (2010).
49. Chee, N. M.-Z., Sinnanaidu, R. P. & Chan, W.-K. Vitamin E improves serum markers and histology in adults with metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: Systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* (2024) doi:10.1111/jgh.16723.
50. Elshaer, A., Chascsa, D. M. H. & Lizaola-Mayo, B. C. Exploring Varied Treatment Strategies for Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD). *Life (Basel)* **14**, 844 (2024).
51. Kim, D. *et al.* Subclinical Hypothyroidism and Low-Normal Thyroid Function Are Associated With Nonalcoholic Steatohepatitis and Fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **16**, 123-131.e1 (2018).
52. Ritter, M. J., Amano, I. & Hollenberg, A. N. Thyroid Hormone Signaling and the Liver. *Hepatology* **72**, 742–752 (2020).
53. Alonso-Merino, E. *et al.* Thyroid hormones inhibit TGF- $\beta$  signaling and attenuate fibrotic responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E3451-3460 (2016).

54. Kelly, M. J. *et al.* Discovery of 2-[3,5-dichloro-4-(5-isopropyl-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-3-yloxy)phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro[1,2,4]triazine-6-carbonitrile (MGL-3196), a Highly Selective Thyroid Hormone Receptor  $\beta$  agonist in clinical trials for the treatment of dyslipidemia. *J Med Chem* **57**, 3912–3923 (2014).
55. Harrison, S. A. *et al.* A Phase 3, Randomized, Controlled Trial of Resmetirom in NASH with Liver Fibrosis. *N Engl J Med* **390**, 497–509 (2024).
56. Gross, B., Pawlak, M., Lefebvre, P. & Staels, B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nat Rev Endocrinol* **13**, 36–49 (2017).
57. Belfort, R. *et al.* A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* **355**, 2297–2307 (2006).
58. Aithal, G. P. *et al.* Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* **135**, 1176–1184 (2008).
59. Cusi, K. *et al.* Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Trial. *Ann Intern Med* **165**, 305–315 (2016).
60. Staels, B., Butruille, L. & Francque, S. Treating NASH by targeting peroxisome proliferator-activated receptors. *J Hepatol* **79**, 1302–1316 (2023).
61. Newsome, P. N. & Ambery, P. Incretins (GLP-1 receptor agonists and dual/triple agonists) and the liver. *J Hepatol* **79**, 1557–1565 (2023).
62. Armstrong, M. J. *et al.* Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet* **387**, 679–690 (2016).
63. Newsome, P. N. *et al.* A Placebo-Controlled Trial of Subcutaneous Semaglutide in Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med* **384**, 1113–1124 (2021).
64. Flint, A. *et al.* Randomised clinical trial: semaglutide versus placebo reduced liver steatosis but not liver stiffness in subjects with non-alcoholic fatty liver disease assessed by magnetic resonance imaging. *Aliment Pharmacol Ther* **54**, 1150–1161 (2021).
65. Loomba, R. *et al.* Combination Therapies Including Cilofexor and Firsocostat for Bridging Fibrosis and Cirrhosis Attributable to NASH. *Hepatology* **73**, 625–643 (2021).

66. Alkhoury, N. *et al.* Safety and efficacy of combination therapy with semaglutide, cilofexor and firsocostat in patients with non-alcoholic steatohepatitis: A randomised, open-label phase II trial. *J Hepatol* **77**, 607–618 (2022).
67. Loomba, R. *et al.* Tirzepatide for Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis with Liver Fibrosis. *N Engl J Med* **391**, 299–310 (2024).
68. Sanyal, A. J. *et al.* A Phase 2 Randomized Trial of Survodutide in MASH and Fibrosis. *N Engl J Med* **391**, 311–319 (2024).
69. Romero-Gómez, M. *et al.* A phase IIa active-comparator-controlled study to evaluate the efficacy and safety of efinopegdutide in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* **79**, 888–897 (2023).
70. Shankar, S. S. *et al.* Safety and Efficacy of Novel Incretin Co-agonist Cotadutide in Biopsy-proven Noncirrhotic MASH With Fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **22**, 1847-1857.e11 (2024).
71. Véniant, M. M. *et al.* A GIPR antagonist conjugated to GLP-1 analogues promotes weight loss with improved metabolic parameters in preclinical and phase 1 settings. *Nat Metab* **6**, 290–303 (2024).
72. Coskun, T. *et al.* LY3437943, a novel triple glucagon, GIP, and GLP-1 receptor agonist for glycemic control and weight loss: From discovery to clinical proof of concept. *Cell Metab* **34**, 1234-1247.e9 (2022).
73. Jastreboff, A. M. *et al.* Triple-Hormone-Receptor Agonist Retatrutide for Obesity - A Phase 2 Trial. *N Engl J Med* **389**, 514–526 (2023).
74. Rosenstock, J. *et al.* Retatrutide, a GIP, GLP-1 and glucagon receptor agonist, for people with type 2 diabetes: a randomised, double-blind, placebo and active-controlled, parallel-group, phase 2 trial conducted in the USA. *Lancet* **402**, 529–544 (2023).
75. Brown, E., Rajeev, S. P., Cuthbertson, D. J. & Wilding, J. P. H. A review of the mechanism of action, metabolic profile and haemodynamic effects of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors. *Diabetes Obes Metab* **21 Suppl 2**, 9–18 (2019).
76. Kuchay, M. S. *et al.* Effect of Empagliflozin on Liver Fat in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Trial (E-LIFT Trial). *Diabetes Care* **41**, 1801–1808 (2018).

77. Kahl, S. *et al.* Empagliflozin Effectively Lowers Liver Fat Content in Well-Controlled Type 2 Diabetes: A Randomized, Double-Blind, Phase 4, Placebo-Controlled Trial. *Diabetes Care* **43**, 298–305 (2020).

78. Miyake, T. *et al.* Ipragliflozin Ameliorates Liver Damage in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Open Med (Wars)* **13**, 402–409 (2018).

79. Tabuchi, H., Maegawa, H., Tobe, K., Nakamura, I. & Uno, S. Effect of ipragliflozin on liver function in Japanese type 2 diabetes mellitus patients: a subgroup analysis of the STELLA-LONG TERM study (3-month interim results). *Endocr J* **66**, 31–41 (2019).

80. Han, E., Lee, Y.-H., Lee, B.-W., Kang, E. S. & Cha, B.-S. Ipragliflozin Additively Ameliorates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Patients with Type 2 Diabetes Controlled with Metformin and Pioglitazone: A 24-Week Randomized Controlled Trial. *J Clin Med* **9**, 259 (2020).

81. Takahashi, H. *et al.* Ipragliflozin Improves the Hepatic Outcomes of Patients With Diabetes with NAFLD. *Hepatol Commun* **6**, 120–132 (2022).

82. Ito, D. *et al.* Long-term effects of ipragliflozin and pioglitazone on metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease in patients with type 2 diabetes: 5 year observational follow-up of a randomized, 24 week, active-controlled trial: Effect of ipragliflozin in MASLD. *J Diabetes Investig* **15**, 1220–1230 (2024).

83. Latva-Rasku, A. *et al.* The SGLT2 Inhibitor Dapagliflozin Reduces Liver Fat but Does Not Affect Tissue Insulin Sensitivity: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study With 8-Week Treatment in Type 2 Diabetes Patients. *Diabetes Care* **42**, 931–937 (2019).

84. Shimizu, M. *et al.* Evaluation of the effects of dapagliflozin, a sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor, on hepatic steatosis and fibrosis using transient elastography in patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab* **21**, 285–292 (2019).

85. Shi, M. *et al.* Effect of dapagliflozin on liver and pancreatic fat in patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *J Diabetes Complications* **37**, 108610 (2023).

86. Harrison, S. A. *et al.* Licogliflozin for nonalcoholic steatohepatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2a study. *Nat Med* **28**, 1432–1438 (2022).

87. Gautam, A., Agrawal, P. K., Doneria, J. & Nigam, A. Effects of Canagliflozin on Abnormal Liver Function Tests in Patients of Type 2 Diabetes with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J Assoc Physicians India* **66**, 62–66 (2018).

88. Seko, Y. *et al.* Efficacy and safety of canagliflozin in type 2 diabetes mellitus patients with biopsy-proven nonalcoholic steatohepatitis classified as stage 1-3 fibrosis. *Diabetes Metab Syndr Obes* **11**, 835–843 (2018).
89. Bajaj, H. S. *et al.* SGLT2 inhibitors and incretin agents: Associations with alanine aminotransferase activity in type 2 diabetes. *Diabetes Metab* **44**, 493–499 (2018).
90. Inoue, M. *et al.* Effects of canagliflozin on body composition and hepatic fat content in type 2 diabetes patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Diabetes Investig* **10**, 1004–1011 (2019).
91. Cusi, K. *et al.* Effect of canagliflozin treatment on hepatic triglyceride content and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* **21**, 812–821 (2019).
92. Arase, Y. *et al.* Effect of Sodium Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors on Liver Fat Mass and Body Composition in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Drug Investig* **39**, 631–641 (2019).
93. Akuta, N. *et al.* Impact of sodium glucose cotransporter 2 inhibitor on histological features and glucose metabolism of non-alcoholic fatty liver disease complicated by diabetes mellitus. *Hepatol Res* **49**, 531–539 (2019).
94. Akuta, N. *et al.* SGLT2 Inhibitor Treatment Outcome in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Complicated with Diabetes Mellitus: The Long-term Effects on Clinical Features and Liver Histopathology. *Intern Med* **59**, 1931–1937 (2020).
95. Lee, K. W. *et al.* Effect of SGLT-2 Inhibitors on Non-alcoholic Fatty Liver Disease among Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: Systematic Review with Meta-analysis and Trial Sequential Analysis of Randomized Clinical Trials. *Oman Med J* **36**, e273 (2021).
96. Nishimiya, N. *et al.* Effects of Canagliflozin on Hepatic Steatosis, Visceral Fat and Skeletal Muscle among Patients with Type 2 Diabetes and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Intern Med* **60**, 3391–3399 (2021).
97. Bellanti, F. *et al.* Impact of sodium glucose cotransporter-2 inhibitors on liver steatosis/fibrosis/inflammation and redox balance in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* **28**, 3243–3257 (2022).

98. Borisov, A. N., Kutz, A., Christ, E. R., Heim, M. H. & Ebrahimi, F. Canagliflozin and Metabolic Associated Fatty Liver Disease in Patients With Diabetes Mellitus: New Insights From CANVAS. *J Clin Endocrinol Metab* **108**, 2940–2949 (2023).
99. Scheen, A. J. An update on the safety of SGLT2 inhibitors. *Expert Opin Drug Saf* **18**, 295–311 (2019).
100. Adorini, L., Pruzanski, M. & Shapiro, D. Farnesoid X receptor targeting to treat nonalcoholic steatohepatitis. *Drug Discov Today* **17**, 988–997 (2012).
101. Neuschwander-Tetri, B. A. *et al.* Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **385**, 956–965 (2015).
102. Younossi, Z. M. *et al.* Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* **394**, 2184–2196 (2019).
103. Rinella, M. E. *et al.* Non-invasive evaluation of response to obeticholic acid in patients with NASH: Results from the REGENERATE study. *J Hepatol* **76**, 536–548 (2022).
104. Lindor, K. D. *et al.* Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. *Hepatology* **39**, 770–778 (2004).
105. Leuschner, U. F. H. *et al.* High-dose ursodeoxycholic acid therapy for nonalcoholic steatohepatitis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hepatology* **52**, 472–479 (2010).
106. Ratziu, V. *et al.* A randomized controlled trial of high-dose ursodesoxycholic acid for nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* **54**, 1011–1019 (2011).
107. Ratziu, V. *et al.* Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$  and - $\delta$ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* **150**, 1147-1159.e5 (2016).
108. GENFIT: Announces Results from Interim Analysis of RESOLVE-IT Phase 3 Trial of Elafibranor in Adults with NASH and Fibrosis | GENFIT. <https://ir.genfit.com/news-releases/news-release-details/genfit-announces-results-interim-analysis-resolve-it-phase-3/>.
109. Francque, S. M. *et al.* A Randomized, Controlled Trial of the Pan-PPAR Agonist Lanifibranor in NASH. *N Engl J Med* **385**, 1547–1558 (2021).

110. Gawrieh, S. *et al.* Saroglitazar, a PPAR- $\alpha/\gamma$  Agonist, for Treatment of NAFLD: A Randomized Controlled Double-Blind Phase 2 Trial. *Hepatology* **74**, 1809–1824 (2021).
111. Goyal, O. *et al.* Saroglitazar in patients with non-alcoholic fatty liver disease and diabetic dyslipidemia: a prospective, observational, real world study. *Sci Rep* **10**, 21117 (2020).
112. Goyal, P., Goyal, O. & Chhina, R. S. Saroglitazar Improves Transaminases and Elastography in Patients with Diabetic Dyslipidemia and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J Assoc Physicians India* **68**, 97 (2020).
113. Rajesh, N. A. *et al.* Safety and Efficacy of Saroglitazar in Nonalcoholic Fatty Liver Patients With Diabetic Dyslipidemia-A Prospective, Interventional, Pilot Study. *J Clin Exp Hepatol* **12**, 61–67 (2022).
114. Siddiqui, M. S. *et al.* Saroglitazar, a Dual PPAR  $\alpha/\gamma$  Agonist, Improves Atherogenic Dyslipidemia in Patients With Non-Cirrhotic Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Pooled Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* S1542-3565(23)00077–0 (2023) doi:10.1016/j.cgh.2023.01.018.
115. Chaudhuri, S., Dutta, A. & Chakraborty, S. B. D. Efficacy and safety of saroglitazar in real-world patients of non-alcoholic fatty liver disease with or without diabetes including compensated cirrhosis: A tertiary care center experience. *JGH Open* **7**, 215–220 (2023).
116. Mir, B. A. *et al.* A Prospective Randomised Comparative Four-arm Intervention Study of Efficacy and Safety of Saroglitazar and Vitamin E in Patients With Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)/Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH)-SVIN TRIAL. *J Clin Exp Hepatol* **14**, 101398 (2024).
117. Seko, Y. *et al.* Effect of pemafibrate on fatty acid levels and liver enzymes in non-alcoholic fatty liver disease patients with dyslipidemia: A single-arm, pilot study. *Hepatol Res* **50**, 1328–1336 (2020).
118. Ikeda, S. *et al.* Pemafibrate Dramatically Ameliorated the Values of Liver Function Tests and Fibrosis Marker in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Yonago Acta Med* **63**, 188–197 (2020).
119. Ikeda, S. *et al.* Pemafibrate Ameliorates Liver Dysfunction and Fatty Liver in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease with Hypertriglyceridemia: A Retrospective Study with the Outcome after a Mid-Term Follow-Up. *Diagnostics (Basel)* **11**, 2316 (2021).

120. Shinozaki, S., Tahara, T., Lefor, A. K. & Ogura, M. Pemafibrate improves hepatic inflammation, function and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a one-year observational study. *Clin Exp Hepatol* **7**, 172–177 (2021).
121. Nakajima, A. *et al.* Randomised clinical trial: Pemafibrate, a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  modulator (SPPARM $\alpha$ ), versus placebo in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* **54**, 1263–1277 (2021).
122. Yokote, K. *et al.* Effects of pemafibrate on glucose metabolism markers and liver function tests in patients with hypertriglyceridemia: a pooled analysis of six phase 2 and phase 3 randomized double-blind placebo-controlled clinical trials. *Cardiovasc Diabetol* **20**, 96 (2021).
123. Morishita, A. *et al.* Pemafibrate improves liver dysfunction and non-invasive surrogates for liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease with hypertriglyceridemia: a multicenter study. *Hepatol Int* (2022) doi:10.1007/s12072-022-10453-1.
124. Sugimoto, R. *et al.* Effect of pemafibrate on liver enzymes and shear wave velocity in non-alcoholic fatty liver disease patients. *Front Med (Lausanne)* **10**, 1073025 (2023).
125. Takahashi, Y. *et al.* Gamma-glutamyl transferase predicts pemafibrate treatment response in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* (2023) doi:10.1111/jgh.16222.
126. Ishikawa, T. *et al.* Effects of body composition and liver function after long-term pemafibrate treatment on dyslipidemia-associated non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Hepatol* **9**, 172–178 (2023).
127. Katsuyama, H., Yanai, H., Adachi, H. & Hakoshima, M. A Significant Effect of Pemafibrate on Hepatic Steatosis and Fibrosis Indexes in Patients With Hypertriglyceridemia. *Gastroenterology Res* **16**, 240–243 (2023).
128. Ono, H. *et al.* Impact of pemafibrate in patients with metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease complicated by dyslipidemia: A single-arm prospective study. *JGH Open* **8**, e13057 (2024).
129. Hassan, M. *et al.* Effect of Pemafibrate on the Lipid Profile, Liver Function, and Liver Fibrosis Among Patients With Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease. *Gastroenterology Res* **17**, 159–174 (2024).

130. Imamura, T. & Kinugawa, K. Combination Therapy Using Pemafibrate and Dapagliflozin for Metabolic Dysfunction-associated Fatty Liver Disease. *Intern Med* **62**, 1371–1373 (2023).
131. Shinozaki, S., Tahara, T., Miura, K., Lefor, A. K. & Yamamoto, H. Effectiveness of One-Year Pemafibrate Therapy on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Refractory to Long-Term Sodium Glucose Cotransporter-2 Inhibitor Therapy: A Pilot Study. *Life (Basel)* **13**, 1327 (2023).
132. Talukdar, S. & Kharitonov, A. FGF19 and FGF21: In NASH we trust. *Mol Metab* **46**, 101152 (2021).
133. Harrison, S. A. *et al.* NGM282 for treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* **391**, 1174–1185 (2018).
134. Harrison, S. A. *et al.* NGM282 Improves Liver Fibrosis and Histology in 12 Weeks in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* **71**, 1198–1212 (2020).
135. Harrison, S. A. *et al.* Efficacy and Safety of Aldafermin, an Engineered FGF19 Analog, in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **160**, 219-231.e1 (2021).
136. Harrison, S. A. *et al.* Aldafermin in patients with non-alcoholic steatohepatitis (ALPINE 2/3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **7**, 603–616 (2022).
137. Rinella, M. E. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of aldafermin in patients with NASH and compensated cirrhosis. *Hepatology* **79**, 674–689 (2024).
138. Harrison, S. A. *et al.* Efruxifermin in non-alcoholic steatohepatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *Nat Med* **27**, 1262–1271 (2021).
139. Harrison, S. A. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of efruxifermin for patients with compensated NASH cirrhosis. *JHEP Rep* **5**, 100563 (2023).
140. Harrison, S. A. *et al.* Safety and efficacy of once-weekly efruxifermin versus placebo in non-alcoholic steatohepatitis (HARMONY): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **8**, 1080–1093 (2023).
141. Harrison, S. A. *et al.* Safety and Efficacy of Efruxifermin in Combination With a GLP-1 Receptor Agonist in Patients With NASH/MASH and Type 2 Diabetes in a Randomized

Phase 2 Study. *Clin Gastroenterol Hepatol* S1542-3565(24)00226-X (2024)  
doi:10.1016/j.cgh.2024.02.022.

142. Alkhouri, N. *et al.* Clinical trial: Effects of pegozafermin on the liver and on metabolic comorbidities in subjects with biopsy-confirmed nonalcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* **58**, 1005–1015 (2023).

143. Loomba, R. *et al.* Randomized, Controlled Trial of the FGF21 Analogue Pegozafermin in NASH. *N Engl J Med* **389**, 998–1008 (2023).

144. Loomba, R. *et al.* Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of pegozafermin in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1b/2a multiple-ascending-dose study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **8**, 120–132 (2023).

145. Lambert, J. E., Ramos-Roman, M. A., Browning, J. D. & Parks, E. J. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **146**, 726–735 (2014).

146. Miyazaki, M. *et al.* Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* **279**, 25164–25171 (2004).

147. Miyazaki, M. *et al.* Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metab* **6**, 484–496 (2007).

148. Iruarrizaga-Lejarreta, M. *et al.* Role of Aramchol in steatohepatitis and fibrosis in mice. *Hepatol Commun* **1**, 911–927 (2017).

149. Ratziu, V. *et al.* Aramchol in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Nat Med* **27**, 1825–1835 (2021).

150. Musazadeh, V., Roshanravan, N., Dehghan, P. & Ahrabi, S. S. Effect of Probiotics on Liver Enzymes in Patients With Non-alcoholic Fatty Liver Disease: An Umbrella of Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Nutr* **9**, 844242 (2022).

151. Huang, Y. *et al.* Effect of Probiotics Therapy on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Comput Math Methods Med* **2022**, 7888076 (2022).

152. Zhou, X. *et al.* Efficacy of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **102**, e32734 (2023).

153. Xue, L., Deng, Z., Luo, W., He, X. & Chen, Y. Effect of Fecal Microbiota Transplantation on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Clinical Trial. *Front Cell Infect Microbiol* **12**, 759306 (2022).
154. Harrison, S. A. *et al.* Selonsertib for patients with bridging fibrosis or compensated cirrhosis due to NASH: Results from randomized phase III STELLAR trials. *J Hepatol* **73**, 26–39 (2020).
155. Anstee, Q. M. *et al.* Cenicriviroc Lacked Efficacy to Treat Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis: AURORA Phase III Randomized Study. *Clin Gastroenterol Hepatol* **22**, 124-134.e1 (2024).
156. Harrison, S. A., Allen, A. M., Dubourg, J., Noureddin, M. & Alkhouri, N. Challenges and opportunities in NASH drug development. *Nat Med* **29**, 562–573 (2023).
157. Cardiovascular diseases. <https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases>.
158. Libby, P. *et al.* Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 56 (2019).
159. Jebari-Benslaiman, S. *et al.* Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* **23**, 3346 (2022).
160. Bessaguet, F., Henrion, D. & Desmoulière, A. Organisation générale des vaisseaux sanguins. *Actualités Pharmaceutiques* **61**, 53–56 (2022).
161. Andersson, C., Johnson, A. D., Benjamin, E. J., Levy, D. & Vasan, R. S. 70-year legacy of the Framingham Heart Study. *Nat Rev Cardiol* **16**, 687–698 (2019).
162. Jankowski, J., Floege, J., Fliser, D., Böhm, M. & Marx, N. Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease. *Circulation* **143**, 1157–1172 (2021).
163. Visseren, F. L. J. *et al.* 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur J Prev Cardiol* **29**, 5–115 (2022).
164. Ridker, P. M. *et al.* Inflammation and cholesterol as predictors of cardiovascular events among patients receiving statin therapy: a collaborative analysis of three randomised trials. *The Lancet* (2023) doi:10.1016/S0140-6736(23)00215-5.
165. Nidorf, S. M., Eikelboom, J. W., Budgeon, C. A. & Thompson, P. L. Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* **61**, 404–410 (2013).

166. Tardif, J.-C. *et al.* Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* **381**, 2497–2505 (2019).
167. Nidorf, S. M. *et al.* Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *N Engl J Med* **383**, 1838–1847 (2020).
168. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* **377**, 1119–1131 (2017).
169. Ridker, P. M. *et al.* IL-6 inhibition with ziltivekimab in patients at high atherosclerotic risk (RESCUE): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* **397**, 2060–2069 (2021).
170. Zhou, Y.-Y. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease contributes to subclinical atherosclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Hepatol Commun* **2**, 376–392 (2018).
171. Stahl, E. P. *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Heart: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol* **73**, 948–963 (2019).
172. Denk, H., Abuja, P. M. & Zatloukal, K. Animal models of NAFLD from the pathologist's point of view. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1865**, 929–942 (2019).
173. Farrell, G. *et al.* Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Toward Optimization of Their Relevance to Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* **69**, 2241–2257 (2019).
174. Fang, T. *et al.* Mouse models of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): pathomechanisms and pharmacotherapies. *Int J Biol Sci* **18**, 5681–5697 (2022).
175. Flessa, C.-M. *et al.* Genetic and Diet-Induced Animal Models for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Research. *Int J Mol Sci* **23**, 15791 (2022).
176. Arsov, T. *et al.* Fat aussie--a new Alström syndrome mouse showing a critical role for ALMS1 in obesity, diabetes, and spermatogenesis. *Mol Endocrinol* **20**, 1610–1622 (2006).
177. Heydet, D. *et al.* A truncating mutation of Alms1 reduces the number of hypothalamic neuronal cilia in obese mice. *Dev Neurobiol* **73**, 1–13 (2013).
178. Asgharpour, A. *et al.* A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J Hepatol* **65**, 579–588 (2016).
179. Pawlak, M. *et al.* The transrepressive activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is necessary and sufficient to prevent liver fibrosis in mice. *Hepatology* **60**, 1593–1606 (2014).

180. Montagner, A. *et al.* Liver PPAR $\alpha$  is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* **65**, 1202–1214 (2016).
181. Régnier, M. *et al.* Hepatocyte-specific deletion of Ppar $\alpha$  promotes NAFLD in the context of obesity. *Sci Rep* **10**, 6489 (2020).
182. Smati, S. *et al.* Integrative study of diet-induced mouse models of NAFLD identifies PPAR $\alpha$  as a sexually dimorphic drug target. *Gut* **71**, 807–821 (2022).
183. Emini Veseli, B. *et al.* Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol* **816**, 3–13 (2017).
184. Montero-Vallejo, R. *et al.* Novel insights into metabolic-associated steatotic liver disease preclinical models. *Liver Int* **44**, 644–662 (2024).
185. Mushenkova, N. V., Summerhill, V. I., Silaeva, Y. Y., Deykin, A. V. & Orekhov, A. N. Modelling of atherosclerosis in genetically modified animals. *Am J Transl Res* **11**, 4614–4633 (2019).
186. Zhao, Y. *et al.* Small rodent models of atherosclerosis. *Biomed Pharmacother* **129**, 110426 (2020).
187. Zhang, Y. *et al.* Research methods for animal models of atherosclerosis (Review). *Mol Med Rep* **24**, 871 (2021).
188. Sullivan, P. M., Mezdour, H., Quarfordt, S. H. & Maeda, N. Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe\*2. *J Clin Invest* **102**, 130–135 (1998).
189. Hennuyer, N. *et al.* PPARalpha, but not PPARgamma, activators decrease macrophage-laden atherosclerotic lesions in a nondiabetic mouse model of mixed dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 1897–1902 (2005).
190. Baron, M. *et al.* PPAR $\alpha$  activation differently affects microparticle content in atherosclerotic lesions and liver of a mouse model of atherosclerosis and NASH. *Atherosclerosis* **218**, 69–76 (2011).
191. Lalloyer, F. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene level differently affects lipid metabolism and inflammation in apolipoprotein E2 knock-in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 1573–1579 (2011).

192. Hennuyer, N. *et al.* The novel selective PPAR $\alpha$  modulator (SPPARM $\alpha$ ) pemafibrate improves dyslipidemia, enhances reverse cholesterol transport and decreases inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **249**, 200–208 (2016).
193. Lefebvre, P., Chinetti, G., Fruchart, J.-C. & Staels, B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* **116**, 571–580 (2006).
194. Pawlak, M., Lefebvre, P. & Staels, B. Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* **62**, 720–733 (2015).
195. Bougarne, N. *et al.* Molecular Actions of PPAR $\alpha$  in Lipid Metabolism and Inflammation. *Endocr Rev* **39**, 760–802 (2018).
196. Palmer, C. N., Hsu, M. H., Griffin, K. J., Raucy, J. L. & Johnson, E. F. Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver. *Mol Pharmacol* **53**, 14–22 (1998).
197. Warden, A. *et al.* Localization of PPAR isotypes in the adult mouse and human brain. *Sci Rep* **6**, 27618 (2016).
198. Lalloyer, F. & Staels, B. Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 894–899 (2010).
199. Fruchart, J.-C. Selective peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$  modulators (SPPARM $\alpha$ ): The next generation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -agonists. *Cardiovasc Diabetol* **12**, 82 (2013).
200. Fruchart, J.-C. Pemafibrate (K-877), a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulator for management of atherogenic dyslipidaemia. *Cardiovasc Diabetol* **16**, 124 (2017).
201. Fruchart, J.-C., Hermans, M. P., Fruchart-Najib, J. & Kodama, T. Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Modulators (SPPARM $\alpha$ ) in the Metabolic Syndrome: Is Pemafibrate Light at the End of the Tunnel? *Curr Atheroscler Rep* **23**, 3 (2021).
202. Blanquart C, Barbier O, Fruchart Jc, Staels B, & Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha ) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes. *The Journal of biological chemistry* **277**, (2002).

203. Burns Ka & Vanden Heuvel Jp. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta* **1771**, (2007).
204. Clavreul, L. *et al.* The ubiquitin-like modifier FAT10 is induced in MASLD and impairs the lipid-regulatory activity of PPAR $\alpha$ . *Metabolism* **151**, 155720 (2024).
205. Leuenberger N, Pradervand S, & Wahli W. Sumoylated PPARalpha mediates sex-specific gene repression and protects the liver from estrogen-induced toxicity in mice. *The Journal of clinical investigation* **119**, (2009).
206. Pourcet B, Pineda-Torra I, Derudas B, Staels B, & Glineur C. SUMOylation of human peroxisome proliferator-activated receptor alpha inhibits its trans-activity through the recruitment of the nuclear corepressor NCoR. *The Journal of biological chemistry* **285**, (2010).
207. Smati, S. *et al.* Regulation of hepatokine gene expression in response to fasting and feeding: Influence of PPAR- $\alpha$  and insulin-dependent signalling in hepatocytes. *Diabetes Metab* **46**, 129–136 (2020).
208. Rakhshandehroo, M. *et al.* Comprehensive analysis of PPARalpha-dependent regulation of hepatic lipid metabolism by expression profiling. *PPAR Res* **2007**, 26839 (2007).
209. Vu-Dac, N. *et al.* Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators. *J Biol Chem* **278**, 17982–17985 (2003).
210. Staels, B. *et al.* Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. *J Clin Invest* **95**, 705–712 (1995).
211. Vu-Dac, N. *et al.* Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *J Biol Chem* **269**, 31012–31018 (1994).
212. Vu-Dac, N. *et al.* Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest* **96**, 741–750 (1995).
213. Staels, B., van Tol, A., Andreu, T. & Auwerx, J. Fibrates influence the expression of genes involved in lipoprotein metabolism in a tissue-selective manner in the rat. *Arterioscler Thromb* **12**, 286–294 (1992).

214. Berthou, L. *et al.* Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. *J Clin Invest* **97**, 2408–2416 (1996).
215. Peters, J. M. *et al.* Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Biol Chem* **272**, 27307–27312 (1997).
216. Rakhshandehroo, M., Knoch, B., Müller, M. & Kersten, S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes. *PPAR Res* **2010**, 612089 (2010).
217. Abdelmegeed, M. A. *et al.* PPARalpha expression protects male mice from high fat-induced nonalcoholic fatty liver. *J Nutr* **141**, 603–610 (2011).
218. Costet, P. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J Biol Chem* **273**, 29577–29585 (1998).
219. Ip, E. *et al.* Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* **38**, 123–132 (2003).
220. Stienstra, R. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against obesity-induced hepatic inflammation. *Endocrinology* **148**, 2753–2763 (2007).
221. Ip, E., Farrell, G., Hall, P., Robertson, G. & Leclercq, I. Administration of the potent PPARalpha agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* **39**, 1286–1296 (2004).
222. Larter, C. Z. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  agonist, Wy 14,643, improves metabolic indices, steatosis and ballooning in diabetic mice with non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* **27**, 341–350 (2012).
223. Shiri-Sverdlov, R. *et al.* Early diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in APOE2 knock-in mice and its prevention by fibrates. *J Hepatol* **44**, 732–741 (2006).
224. Honda, Y. *et al.* Pemafibrate, a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulator, improves the pathogenesis in a rodent model of nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Rep* **7**, 42477 (2017).
225. Sasaki, Y. *et al.* Pemafibrate, a selective PPAR $\alpha$  modulator, prevents non-alcoholic steatohepatitis development without reducing the hepatic triglyceride content. *Sci Rep* **10**, 7818 (2020).
226. Lefebvre, P. *et al.* Interspecies NASH disease activity whole-genome profiling identifies a fibrogenic role of PPAR $\alpha$ -regulated dermatopontin. *JCI Insight* **2**, 92264 (2017).

227. Toyama, T. *et al.* PPAR $\alpha$  ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **324**, 697–704 (2004).
228. Rodríguez-Vilarrupla, A. *et al.* PPAR $\alpha$  activation improves endothelial dysfunction and reduces fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats. *Journal of Hepatology* **56**, 1033–1039 (2012).
229. Laurin, J. *et al.* Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcohol-induced steatohepatitis: a pilot study. *Hepatology* **23**, 1464–1467 (1996).
230. Basaranoglu, M., Acbay, O. & Sonsuz, A. A controlled trial of gemfibrozil in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* **31**, 384 (1999).
231. Fernández-Miranda, C. *et al.* A pilot trial of fenofibrate for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* **40**, 200–205 (2008).
232. Francque, S. *et al.* PPAR $\alpha$  gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* **63**, 164–173 (2015).
233. Duez, H. *et al.* Reduction of atherosclerosis by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate in mice. *J Biol Chem* **277**, 48051–48057 (2002).
234. Li, A. C. *et al.* Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest* **114**, 1564–1576 (2004).
235. Srivastava, R. A. K., Jahagirdar, R., Azhar, S., Sharma, S. & Bisgaier, C. L. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha selective ligand reduces adiposity, improves insulin sensitivity and inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Mol Cell Biochem* **285**, 35–50 (2006).
236. Kooistra, T. *et al.* Fenofibrate reduces atherogenesis in ApoE\*3Leiden mice: evidence for multiple antiatherogenic effects besides lowering plasma cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 2322–2330 (2006).
237. Inaba, T. *et al.* Cholesterol reduction and atherosclerosis inhibition by bezafibrate in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Hypertens Res* **31**, 999–1005 (2008).

238. Konishi, H. *et al.* Effect of pemafibrate (K-877), a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  modular (SPPARM $\alpha$ ), in atherosclerosis model using low density lipoprotein receptor knock-out swine with balloon injury. *PLoS One* **15**, e0241195 (2020).
239. Barbier, O. *et al.* Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 717–726 (2002).
240. Miao, M. *et al.* Targeting PPARs for therapy of atherosclerosis: A review. *Int J Biol Macromol* 125008 (2023) doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.125008.
241. Zheng, Y. *et al.* PPARs in atherosclerosis: The spatial and temporal features from mechanism to druggable targets. *J Adv Res* S2090-1232(24)00120–6 (2024) doi:10.1016/j.jare.2024.03.020.
242. Teissier, E. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces NADPH oxidase activity in macrophages, leading to the generation of LDL with PPAR-alpha activation properties. *Circ Res* **95**, 1174–1182 (2004).
243. Staels, B. *et al.* Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* **393**, 790–793 (1998).
244. Gizard, F. *et al.* PPAR alpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation underlying intimal hyperplasia by inducing the tumor suppressor p16INK4a. *J Clin Invest* **115**, 3228–3238 (2005).
245. Marx, N. *et al.* PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res* **90**, 703–710 (2002).
246. Jones, D. C., Ding, X. & Daynes, R. A. Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) is expressed in resting murine lymphocytes. The PPARalpha in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent. *J Biol Chem* **277**, 6838–6845 (2002).
247. Neve, B. P. *et al.* PPARalpha agonists inhibit tissue factor expression in human monocytes and macrophages. *Circulation* **103**, 207–212 (2001).
248. Marx, N. *et al.* PPARalpha activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes. *Circulation* **103**, 213–219 (2001).

249. Arts, J., Kockx, M., Princen, H. M. & Kooistra, T. Studies on the mechanism of fibrate-inhibited expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured hepatocytes from cynomolgus monkey. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 26–32 (1997).
250. Kockx, M., Princen, H. M. & Kooistra, T. Fibrate-modulated expression of fibrinogen, plasminogen activator inhibitor-1 and apolipoprotein A-I in cultured cynomolgus monkey hepatocytes -- role of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Thromb Haemost* **80**, 942–948 (1998).
251. Durrington, P. N. *et al.* Effects of two different fibric acid derivatives on lipoproteins, cholesteryl ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis* **138**, 217–225 (1998).
252. Kockx, M. *et al.* Effects of gemfibrozil and ciprofibrate on plasma levels of tissue-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1 and fibrinogen in hyperlipidaemic patients. *Thromb Haemost* **78**, 1167–1172 (1997).
253. Frick, M. H. *et al.* Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* **317**, 1237–1245 (1987).
254. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* **344**, 1383–1389 (1994).
255. Rubins, H. B. *et al.* 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**, 410–418 (1999).
256. Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study. Secondary prevention by raising HDL cholesterol and reducing triglycerides in patients with coronary artery disease. *Circulation* **102**, 21–27 (2000).
257. Meade, T., Zuhrie, R., Cook, C. & Cooper, J. Bezafibrate in men with lower extremity arterial disease: randomised controlled trial. *BMJ* **325**, 1139 (2002).
258. Keech, A. *et al.* Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet* **366**, 1849–1861 (2005).

259. ACCORD Study Group *et al.* Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* **362**, 1563–1574 (2010).
260. Elam, M. B. *et al.* Association of Fenofibrate Therapy With Long-term Cardiovascular Risk in Statin-Treated Patients With Type 2 Diabetes. *JAMA Cardiol* **2**, 370–380 (2017).
261. Pradhan, A. D. *et al.* Rationale and design of the Pemafibrate to Reduce Cardiovascular Outcomes by Reducing Triglycerides in Patients with Diabetes (PROMINENT) study. *Am Heart J* **206**, 80–93 (2018).
262. Das Pradhan, A. *et al.* Triglyceride Lowering with Pemafibrate to Reduce Cardiovascular Risk. *N Engl J Med* **387**, 1923–1934 (2022).
263. Lee, S. S. *et al.* Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* **15**, 3012–3022 (1995).
264. Ishibashi, S. *et al.* Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* **92**, 883–893 (1993).
265. Nakai, H. *et al.* Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol* **79**, 214–224 (2005).
266. Chen, S.-J. *et al.* Biodistribution of AAV8 vectors expressing human low-density lipoprotein receptor in a mouse model of homozygous familial hypercholesterolemia. *Hum Gene Ther Clin Dev* **24**, 154–160 (2013).
267. Kiourtis, C. *et al.* Specificity and off-target effects of AAV8-TBG viral vectors for the manipulation of hepatocellular gene expression in mice. *Biol Open* **10**, bio058678 (2021).
268. Hao, Y. *et al.* Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis. *Nat Biotechnol* **42**, 293–304 (2024).
269. Lassale, C. *et al.* Elements of the complete blood count associated with cardiovascular disease incidence: Findings from the EPIC-NL cohort study. *Sci Rep* **8**, 3290 (2018).
270. Gao, Y. *et al.* Upregulation of hepatic VLDLR via PPAR $\alpha$  is required for the triglyceride-lowering effect of fenofibrate. *J Lipid Res* **55**, 1622–1633 (2014).

271. Brocker, C. N. *et al.* Extrahepatic PPAR $\alpha$  modulates fatty acid oxidation and attenuates fasting-induced hepatosteatosis in mice. *J Lipid Res* **59**, 2140–2152 (2018).
272. Borén, J. *et al.* Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* **41**, 2313–2330 (2020).
273. Ginsberg, H. N. *et al.* Triglyceride-rich lipoproteins and their remnants: metabolic insights, role in atherosclerotic cardiovascular disease, and emerging therapeutic strategies—a consensus statement from the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* **42**, 4791–4806 (2021).
274. Mach, F. *et al.* 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J* **41**, 111–188 (2020).
275. Siddiqui, M. S. *et al.* Severity of nonalcoholic fatty liver disease and progression to cirrhosis are associated with atherogenic lipoprotein profile. *Clin Gastroenterol Hepatol* **13**, 1000-1008.e3 (2015).
276. Scott, R. *et al.* Effects of fenofibrate treatment on cardiovascular disease risk in 9,795 individuals with type 2 diabetes and various components of the metabolic syndrome: the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study. *Diabetes Care* **32**, 493–498 (2009).
277. Elam, M., Lovato, L. & Ginsberg, H. The ACCORD-Lipid study: implications for treatment of dyslipidemia in Type 2 diabetes mellitus. *Clin Lipidol* **6**, 9–20 (2011).
278. Staels, B., Maes, M. & Zambon, A. Fibrates and future PPAR $\alpha$  agonists in the treatment of cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **5**, 542–553 (2008).
279. Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauça, M. & Wahli, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$  in the adult rat. *Endocrinology* **137**, 354–366 (1996).
280. Tabula Muris Consortium *et al.* Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. *Nature* **562**, 367–372 (2018).
281. Mansouri, R. *et al.* Atheroprotective effect of human apolipoprotein A5 in a mouse model of mixed dyslipidemia. *Circulation research* **103**, (2008).
282. Calkin, A. C. *et al.* Transgenic expression of dominant-active IDOL in liver causes diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in mice. *Circ Res* **115**, 442–449 (2014).

283. Kitajima, K. *et al.* Complete prevention of atherosclerosis in apoE-deficient mice by hepatic human apoE gene transfer with adeno-associated virus serotypes 7 and 8. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1852–1857 (2006).
284. Kassim, S. H. *et al.* Gene therapy in a humanized mouse model of familial hypercholesterolemia leads to marked regression of atherosclerosis. *PLoS One* **5**, e13424 (2010).
285. Soehnlein, O. & Libby, P. Targeting inflammation in atherosclerosis - from experimental insights to the clinic. *Nat Rev Drug Discov* **20**, 589–610 (2021).
286. Ramji, D. P. & Davies, T. S. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev* **26**, 673–685 (2015).
287. Sun, X. *et al.* Transcriptional switch of hepatocytes initiates macrophage recruitment and T-cell suppression in endotoxemia. *J Hepatol* **77**, 436–452 (2022).
288. Hoogerland, J. A., Staels, B. & Dombrowicz, D. Immune-metabolic interactions in homeostasis and the progression to NASH. *Trends Endocrinol Metab* **33**, 690–709 (2022).
289. Wallace, S. J., Tacke, F., Schwabe, R. F. & Henderson, N. C. Understanding the cellular interactome of non-alcoholic fatty liver disease. *JHEP Rep* **4**, 100524 (2022).
290. Gong, J., Tu, W., Liu, J. & Tian, D. Hepatocytes: A key role in liver inflammation. *Front Immunol* **13**, 1083780 (2022).
291. Wang, X., Feuerstein, G. Z., Gu, J. L., Lysko, P. G. & Yue, T. L. Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **115**, 89–98 (1995).
292. Broch, K. *et al.* Randomized Trial of Interleukin-6 Receptor Inhibition in Patients With Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* **77**, 1845–1855 (2021).
293. Toldo, S. & Abbate, A. The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol* **15**, 203–214 (2018).
294. Ridker, P. M. & Rane, M. Interleukin-6 Signaling and Anti-Interleukin-6 Therapeutics in Cardiovascular Disease. *Circ Res* **128**, 1728–1746 (2021).
295. Bhatt, D. L. *et al.* Effects of Icosapent Ethyl on Total Ischemic Events: From REDUCE-IT. *J Am Coll Cardiol* **73**, 2791–2802 (2019).

296. Chou, R. *et al.* Statin Use for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease in Adults: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA* **328**, 754–771 (2022).
297. Bhatt, D. L. *et al.* Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med* **380**, 11–22 (2019).
298. Mason, R. P., Libby, P. & Bhatt, D. L. Emerging Mechanisms of Cardiovascular Protection for the Omega-3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **40**, (2020).
299. Sherratt, S. C. R., Libby, P., Budoff, M. J., Bhatt, D. L. & Mason, R. P. Role of Omega-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease: the Debate Continues. *Current atherosclerosis reports* **25**, (2023).
300. Willson, T. M., Brown, P. J., Sternbach, D. D. & Henke, B. R. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* **43**, 527–550 (2000).
301. Gonzalez, F. J. & Shah, Y. M. PPARalpha: mechanism of species differences and hepatocarcinogenesis of peroxisome proliferators. *Toxicology* **246**, 2–8 (2008).
302. Yamashita, S., Masuda, D. & Matsuzawa, Y. Clinical Applications of a Novel Selective PPAR $\alpha$  Modulator, Pemafibrate, in Dyslipidemia and Metabolic Diseases. *J Atheroscler Thromb* **26**, 389–402 (2019).
303. Paumelle, R. *et al.* Acute antiinflammatory properties of statins involve peroxisome proliferator-activated receptor-alpha via inhibition of the protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* **98**, 361–369 (2006).
304. Paumelle, R. & Staels, B. Peroxisome proliferator-activated receptors mediate pleiotropic actions of statins. *Circ Res* **100**, 1394–1395 (2007).
305. Subramanian, S. *et al.* Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res* **52**, 1626–1635 (2011).
306. Bieghe, V. *et al.* LDL Receptor Knock-Out Mice Are a Physiological Model Particularly Vulnerable to Study the Onset of Inflammation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One* **7**, e30668 (2012).
307. Garcia-Jaramillo, M. *et al.* Lipidomic and transcriptomic analysis of western diet-induced nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in female Ldlr  $-/-$  mice. *PLoS One* **14**, e0214387 (2019).

308. van den Hoek, A. M. *et al.* A Translational Mouse Model for NASH with Advanced Fibrosis and Atherosclerosis Expressing Key Pathways of Human Pathology. *Cells* **9**, 2014 (2020).
309. Guerre-Millo, M. *et al.* PPAR-alpha-null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* **50**, 2809–2814 (2001).
310. Guerre-Millo, M. *et al.* Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\alpha$  Activators Improve Insulin Sensitivity and Reduce Adiposity\*. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 16638–16642 (2000).
311. Lalloyer, F. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha improves pancreatic adaptation to insulin resistance in obese mice and reduces lipotoxicity in human islets. *Diabetes* **55**, 1605–1613 (2006).
312. Araki, M. *et al.* The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) Agonist Pemafibrate Protects against Diet-Induced Obesity in Mice. *Int J Mol Sci* **19**, 2148 (2018).
313. Tordjman, K. *et al.* PPARalpha deficiency reduces insulin resistance and atherosclerosis in apoE-null mice. *J Clin Invest* **107**, 1025–1034 (2001).
314. Babaev, V. R. *et al.* Macrophage expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* **116**, 1404–1412 (2007).
315. Cherubini, A., Della Torre, S., Pelusi, S. & Valenti, L. Sexual dimorphism of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Trends Mol Med* S1471-4914(24)00135–7 (2024) doi:10.1016/j.molmed.2024.05.013.
316. Crisafulli, C. *et al.* PPAR-alpha contributes to the anti-inflammatory activity of 17beta-estradiol. *J Pharmacol Exp Ther* **331**, 796–807 (2009).
317. Mansukhani, N. A. *et al.* Sex Differences in the LDL Receptor Knockout Mouse Model of Atherosclerosis. *Artery Res* **20**, 8–11 (2017).
318. Chen, Q. *et al.* Association between liver fibrosis scores and the risk of mortality among patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* **299**, 45–52 (2020).





**ANNEXE 1**



**Anti-inflammatory, but not lipid-lowering activity of hepatocyte PPAR $\alpha$  improves atherosclerosis in *Ldlr*-deficient mice**

Doriane Henry<sup>1</sup>, Eric Baugé<sup>1</sup>, Nathalie Hennuyer<sup>1</sup>, Kevin Ory<sup>1</sup>, Bruno Derudas<sup>1</sup>, Emmanuelle Vallez<sup>1</sup>, Audrey Deprince<sup>1</sup>, Philippe Lefebvre<sup>1</sup>, Joel T Haas<sup>1</sup>, Bart Staels<sup>1</sup>, Fanny Lalloyer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ. Lille, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011-EGID, F-59000, Lille, France

**Corresponding author :** Fanny Lalloyer - Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette BP245 59019 LILLE – France. Tel: +33 320877996 - Fax: +33 320877360. E-mail: [fanny.lalloyer@pasteur-lille.fr](mailto:fanny.lalloyer@pasteur-lille.fr)

## ABSTRACT

Atherogenic dyslipidemia and chronic inflammation appear strongly associated with residual cardiovascular disease (CVD) risk. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) agonists, which exert both triglyceride-lowering and anti-inflammatory properties, are potential therapeutic candidates to target residual CVD risk. However, CVD outcome studies with these drugs have yielded mixed results for currently unclear reasons. In this study, we compared the impact of hepatocyte anti-inflammatory (transrepression) vs lipid-lowering (transactivation) properties of PPAR $\alpha$  agonism on atherosclerosis in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. PPAR $\alpha$  agonist treatment reduced aortic atherosclerotic plaque surface in western diet-fed *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice expressing in hepatocytes either PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> or a transrepression-selective PPAR $\alpha$  mutant (PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>), despite the lack of atherogenic dyslipidemia improvement with PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>. Mechanistically, ligand-activated hepatocyte-specific transrepressive PPAR $\alpha$  activity decreased NF- $\kappa$ B signaling pathway and recruitment of leukocytes in the liver, reduced plasma IL-1 $\beta$  levels and limited atherosclerotic plaque macrophage recruitment. These findings identify a distal effect of hepatic PPAR $\alpha$  on vascular integrity rather linked to its anti-inflammatory activity than its lipid-lowering actions, and highlight an essential role of targeting inflammation in CVD.

## SUMMARY

By targeting hepatic inflammation, pemafibrate reduces atherosclerosis in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice, supporting the role of inflammation in cardiovascular risk.

## INTRODUCTION

Elevated low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) levels are currently considered to be the leading cardiovascular risk factor (1). However, beyond successful LDL-C reduction through lifestyle intervention or therapeutic agents such as statins, numerous clinical trials have noted a residual cardiovascular disease (CVD) risk in many patients (2). Recent data implicate plasma triglycerides (TG) and/or remnant cholesterol in this residual risk (3). Therefore, fibrates, lipid-lowering drugs exerting strong TG and remnant lipoprotein cholesterol-lowering activities (4), have been proposed as promising agents to reduce this cardiovascular risk. Fibrates exert multiple pharmacological actions by acting as synthetic agonists for peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), a nuclear receptor mainly expressed in tissues with high levels of fatty acid oxidation, particularly the liver (and especially hepatocytes) (5, 6). PPAR $\alpha$  controls both lipid metabolism and inflammation. Indeed, after activation by an agonist, PPAR $\alpha$  regulates the expression of genes involved in fatty acid transport and  $\beta$ -oxidation by a mechanism of transactivation dependent on DNA binding. In addition, PPAR $\alpha$  also exerts anti-inflammatory properties through a mechanism of transrepression, independent of DNA-binding, by negatively interfering with pathways such as activating protein-1 (AP-1), nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) or CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP) (7–9).

Until now, the cardioprotective effects of fibrates were thought to be linked to their hypolipidemic effects, as observed in many preclinical animal studies (10–15), and also suggested by human trials (16–20). Indeed, despite the fact that the primary outcome of coronary events was not significant, fenofibrate treatment reduced total cardiovascular events in patients with metabolic syndrome features in the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study (16), and this effect was more pronounced in subjects with marked dyslipidemia (17). In line, in the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD)-lipid trial (18), fenofibrate treatment reduced the rate of cardiovascular events in a

subgroup of patients with hypertriglyceridemia and low high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) levels (19). In addition, the ACCORD follow-on (ACCORDION) study showed continued benefit of fenofibrate in this subgroup of patients (20). More recently, despite significant reductions in TG, very low-density lipoprotein-cholesterol (VLDL-C) and remnant cholesterol levels, pemafibrate treatment did not show significant effects on the incidence of cardiovascular events in statin-treated diabetic subjects with hypertriglyceridemia and low HDL-C levels (Pemafibrate to Reduce Cardiovascular Outcomes by Reducing Triglycerides in Patients with Diabetes (PROMINENT) trial) (21). Interestingly, genetic analysis of the ACCORD trial subjects identified a PPAR $\alpha$  gene variant associated with CVD reduction in response to fenofibrate independent of atherogenic dyslipidemia (22). These observations suggest that PPAR $\alpha$  may lower CVD risk through other mechanisms than lipid lowering and may explain the failure of trials recruiting patients on basis of their baseline TG levels. Since PPAR $\alpha$  also exhibits anti-inflammatory properties through its transrepressive activity (8, 9) and given the growing interest of inflammation in the contribution of CVD risk (23, 24), we hypothesized that PPAR $\alpha$  may exert atheroprotective effects through its transrepressive anti-inflammatory effects.

To test this hypothesis, we used pemafibrate, a highly potent and selective PPAR $\alpha$  agonist used in the PROMINENT trial (25–29). In pre-clinical studies, pemafibrate decreased atherosclerosis development, with both improved lipid metabolism and decreased inflammation in the ApoE2KI mouse model of atherosclerosis (30). In addition, pemafibrate inhibited inflammation in balloon-injured coronary arteries of LDL-receptor (LDLR)-deficient swine (31). In the present study, the cardioprotective effects of pemafibrate were assessed in western diet (WD)-fed *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice, a mouse model of dyslipidemia-induced atherosclerosis exhibiting an interrupted sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP2)-LDLR pathway required for the LDL-C-lowering activity of statins. To investigate the importance of the anti-

inflammatory properties of hepatic PPAR $\alpha$ , we also analyzed a PPAR $\alpha$  mutant, PPAR $\alpha$ DISS,, which only exerts PPAR $\alpha$  transrepressive activity (32). We generated Ppara-deficient Ldlr $^{-/-}$  mice, selectively expressing PPAR $\alpha$ WT or PPAR $\alpha$ DISS in hepatocytes, and evaluated the potential cardioprotective effect of pemafibrate in these two models.

Interestingly, we found that modulation of hepatic inflammation was sufficient for mediating the atheroprotective effects of pemafibrate in Ldlr $^{-/-}$  mice. These results highlight the importance of the liver and hepatocyte PPAR $\alpha$  transrepressive activity in the cardioprotective effects of pemafibrate, suggesting that mechanisms independent of lipid lowering, but linked to inflammation control are involved.

## RESULTS

### **Pemafibrate decreases atherosclerosis in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice in a PPAR $\alpha$ -dependent manner**

*Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> and *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice were fed a western diet, supplemented (WD+P) or not (WD) with pemafibrate (0.018g/kg of diet) during 8 weeks. At the end of the period, atherosclerotic lesion surfaces were quantified on histological aortic sections stained with oil red O and counterstained with hematoxylin (Figure 1A-C). No significant difference in mean lesion area was observed between *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> and *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice fed the western diet (Figure 1B). Interestingly, pemafibrate strongly reduced the mean lesion area by 50% in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>, but not in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice. These results indicate that pemafibrate exerts PPAR $\alpha$ -dependent atheroprotective effects in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. As systemic blood cells, especially white blood cells (WBC), play a role in atherosclerosis development (33), peripheral blood leukocytes were counted in the four groups of mice at the end of the 8-week western diet (Supplementary table 1). All *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice exhibited similar WBC counts and subtype distributions, including monocytes, suggesting no role of circulating WBC in the pemafibrate-induced atheroprotection in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.

### **Pemafibrate improves the atherogenic plasma lipid profile in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice in a PPAR $\alpha$ -dependent manner**

Plasma levels of lipids (TG, total cholesterol (TC) and free fatty acids (FFA)) were measured at the end of the western diet-feeding period. As expected, plasma TG levels were higher in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice compared to *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mice (Figure 2A). Pemafibrate supplementation decreased plasma TG levels in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>, but not in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice. Plasma TG distribution profiles, assessed by fast protein liquid chromatography (FPLC), indicated that pemafibrate treatment decreased plasma TG in the VLDL fraction (Figure 2B). Plasma TC levels were similar between *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> and *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice fed the western

diet (Figure 2C). However, pemafibrate also significantly reduced plasma TC levels in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>, but not in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice, due to a reduction of plasma non-HDL-C levels (Figure 2D-E). Plasma cholesterol distribution profile analysis indicated a decrease of plasma TC associated to the VLDL fraction in pemafibrate-treated *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mice (Figure 2F). Finally, *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice exhibited higher plasma FFA levels compared to *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mice (Figure 2G). Pemafibrate decreased FFA levels in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>, but not in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice. Altogether, these results demonstrate that pemafibrate improves the atherogenic plasma lipid profile in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice in a PPAR $\alpha$ -dependent manner.

### **Pemafibrate improves hepatic lipid metabolism and inflammation in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice in a PPAR $\alpha$ -dependent manner**

To evaluate if pemafibrate can induce both PPAR $\alpha$  transactivation and transrepression activities in the liver of *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice, we first measured the hepatic expression of its target genes involved in lipid metabolism and linked to hepatic PPAR $\alpha$  transactivation activity (Figure 2H). Pemafibrate treatment increased the hepatic mRNA expression of PPAR $\alpha$  target genes related to peroxisomal lipid  $\beta$ -oxidation such as acyl-CoA oxidase (*Aco*) and bifunctional enzyme (*Bien*), mitochondrial  $\beta$ -oxidation such as medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (*Mcad*), long-chain acyl-CoA dehydrogenase (*Lcad*) and very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (*Vlcad*), FFA uptake like fatty acid transporter (*Cd36*), fatty acid binding protein 1 (*Fabp1*) and fatty acid transport protein 1 (*Fatp1*) and VLDL removal like VLDL receptor (*Vldlr*) in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mice, but not in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice. No difference was observed in the hepatic mRNA expression of microsomal triglyceride transfer protein (*Mttp*), involved in VLDL synthesis. These results indicate that pemafibrate improves hepatic lipid metabolism and that it decreases plasma hyperlipidemia through increased VLDL and remnant removal by the liver in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice, as already suggested (34). Hepatic expression of inflammatory genes was surprisingly globally higher in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> compared to *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice. In line with

the transrepressive activity of PPAR $\alpha$ , pemafibrate decreased hepatic mRNA expression of inflammatory genes such as inflammasome-related NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (*Nlrp3*) and *Caspase-1*, pro-inflammatory cytokines like tumor necrosis factor (*Tnf*)- $\alpha$  and interleukin (*Il*)-1 $\beta$ , chemokines including C-C Motif Chemokine Ligand 3 (*Ccl3*), C-X-C Motif Chemokine Ligand 2 (*Cxcl2*), fractalkine (*Cx3cl1*) and monocyte chemoattractant protein 1 (*Mcp-1*), and the acute phase response protein serum amyloid  $\alpha$  (*Saa*) in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>, but not in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice (Figure 2I). In addition, pemafibrate also reduced the hepatic mRNA expression of *Cd68*, a macrophage marker in a PPAR $\alpha$ -dependent manner. Altogether, these data suggest an improvement of hepatic inflammation by pemafibrate in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice in a PPAR $\alpha$ -dependent manner.

To determine whether modulation of hepatic gene expression by pemafibrate was associated with functional responses of the liver on lipid metabolism and inflammation, histological analysis of liver sections stained with hematoxylin and eosin (H&E) was performed (Supplementary figure 1A) and the levels of hepatic steatosis and inflammation were scored. As already observed in other mouse models (15, 35–37), *Ppara*-deficiency aggravated the hepatic steatosis score in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice (Supplementary figure 1B). Pemafibrate significantly reduced the hepatic steatosis score, with a trend towards decreased inflammation score in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>, but not in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice (Supplementary figure 1C). However, pemafibrate treatment significantly decreased CD68-positive cells in livers of *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>, but not *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice, indicating less hepatic inflammation (Supplementary figure 1D-E). Altogether, these results indicate that pemafibrate supplementation improves both hepatic lipid metabolism and inflammation in a PPAR $\alpha$ -dependent manner in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.

## **Hepatocyte PPAR $\alpha$ mediates pemafibrate-induced improvement of hepatic lipid metabolism and inflammation**

To evaluate the role of hepatocyte PPAR $\alpha$  in the beneficial metabolic and cardiovascular effects of pemafibrate in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice, PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> was restored in livers of *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> using a serotype 8 adeno-associated virus (AAV8) driving hepato-specific PPAR $\alpha$  expression through the thyroxin binding globulin (TBG) promoter (AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> mice) (38–40) (Supplementary figure 2A). To selectively restore the transrepressive activity of PPAR $\alpha$  in hepatocytes only, *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice were in parallel injected with the PPAR $\alpha$  mutant, PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>, which exerts only PPAR $\alpha$  transrepressive activity (32) (AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice) (Supplementary figure 2B). As control, *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice were injected with a green fluorescent protein (GFP)-encoding AAV8 (AAV8-GFP mice). 3 weeks after the injection, mice were fed the western diet supplemented or not with pemafibrate during a further 8 weeks (Supplementary figure 2A). At the end of the diet, *Ppara* mRNA and protein expression was clearly detectable in livers of AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> and AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice with or without pemafibrate, but to a lesser extent compared to whole-body *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mice (Supplementary figure 3A-B).

As expected, pemafibrate increased hepatic expression of lipid metabolism genes in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>, but not in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice (Figure 3A), whereas hepatic mRNA expression of inflammatory genes decreased both in pemafibrate treated AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> and AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice (Figure 3B). Of note, pemafibrate significantly reduced hepatic mRNA expression of the *Ppara* target gene, *Cd36*, in the liver of AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice (Figure 3A). Altogether, this confirms the ability of pemafibrate to induce both PPAR $\alpha$  transactivation and transrepression activities in the liver of AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> mice, but only PPAR $\alpha$  transrepression activity in the liver of AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice. Contrary to whole-body *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> vs *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mice, the restoration of PPAR $\alpha$  only in hepatocytes of *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice (AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>) did not improve liver steatosis when compared to AAV8-GFP mice, suggesting a

role of extra-hepatic PPAR $\alpha$  in the improvement of hepatic lipid accumulation in whole-body *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>, as already suggested previously (41). Moreover, pemafibrate strongly decreased hepatic steatosis in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> mice (-67%), and to a lesser extent in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice (-25%) (Figure 3C-D). Pemafibrate did not induce changes in hepatic inflammatory score in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> or AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice (Figure 3E). However, it significantly decreased CD68-positive cells in livers of both AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> and AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice, indicating less intra-hepatic macrophages upon pemafibrate treatment (Figure 3F-G).

### **Pemafibrate improves atherogenic dyslipidemia through hepatocyte PPAR $\alpha$ transactivation activity**

Plasma levels of lipids were determined in AAV8-injected *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> at the end of the diet. Pemafibrate reduced plasma TG and TC levels in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>, but not in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice (Figure 4A-B). These effects in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> mice were associated with a significant pemafibrate-induced decrease in plasma non-HDL-C levels and to a lesser extent, HDL-C levels (Figure 4C-D). TG and TC lipoprotein distribution profiles revealed decreased VLDL, and to a lesser extent LDL fraction upon pemafibrate supplementation only in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> mice, but not in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice (Figure 4E-F). In addition, AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> mice treated with pemafibrate exhibited lower plasma FFA levels, an effect which was not observed in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice (Figure 4G). Altogether, these results demonstrate that hepatocyte PPAR $\alpha$  transactivation activity is required for pemafibrate to improve atherogenic dyslipidemia in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.

### **Pemafibrate reduces atherosclerosis development through hepatocyte PPAR $\alpha$ transrepressive activity**

As pemafibrate corrects dyslipidemia only following activation of hepatocyte PPAR $\alpha^{\text{WT}}$ , and knowing the importance of dyslipidemia for atherosclerosis development (1, 3, 42), the effects of pemafibrate on atherosclerosis progression were evaluated in AAV8-PPAR $\alpha^{\text{WT}}$  and AAV8-PPAR $\alpha^{\text{DISS}}$  mice. Surprisingly, pemafibrate decreased the mean surface of atherosclerosis lesions to the same extent in mice injected with AAV8-PPAR $\alpha^{\text{WT}}$  or with AAV8-PPAR $\alpha^{\text{DISS}}$  (-42% in both pemafibrate-treated AAV8-PPAR $\alpha^{\text{WT}}$  and AAV8-PPAR $\alpha^{\text{DISS}}$  mice) (Figure 5A-C). These results demonstrate that specific activation of hepatocyte PPAR $\alpha$  transrepressive activity by pemafibrate is sufficient to reduce atherosclerosis in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice, independently of dyslipidemia improvement.

### **Pemafibrate limits a pro-inflammatory phenotype in hepatocytes and reduces leukocyte recruitment through hepatocyte PPAR $\alpha$ transrepressive activity**

To understand the pemafibrate-induced mechanisms linking the activation of PPAR $\alpha$  in the liver to its atheroprotective effect in the plaque, we hypothesized that pemafibrate, through the transrepressive activity of hepatocyte PPAR $\alpha$ , reduces hepatic production and release of pro-inflammatory cytokines and factors, thus limiting systemic inflammation and, consequently, their impact on the atherosclerotic plaque. To understand the mechanisms operative in the liver, single nuclei-RNA sequencing (snRNA-seq) was performed on livers from the 6 groups of AAV8-injected western diet-fed *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice (Figure 6). Using manually curated gene markers, nuclei were assigned to 7 major distinct clusters, each corresponding to a unique cell type: hepatocytes, endothelial cells, hepatic stellate cells (HSCs), myeloid cells, T<sub>NK</sub><sub>NKT</sub> cells, B cells and neutrophils (Figure 6A). Gene markers of hepatic and immune cell types were exclusively expressed in the corresponding cells (Figure 6B). The expression distribution of

cell type-specific markers was specific to each cluster: *Hnf4a* in hepatocytes, *Kdr* in endothelial cells, *Dcn* in HSCs, *Sirpa* in myeloid cells, *Skap1* in T\_NK\_NKT cells, *Ebfl* in B cells and *Csf3r* in neutrophils (Supplementary figure 4B). The identity of each cell type was further confirmed by analysis of the top 50 differentially expressed genes in each cluster (Supplementary figure 4C, Supplementary data 1). Assessment of the expression of *Ppara* in the liver nuclei of the AAV-mediated PPAR $\alpha$ -restored *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice showed expression of *Ppara* exclusively in the hepatocyte cluster, confirming the hepatocyte-specific reconstitution of PPAR $\alpha$  with the AAV8-TBG vector (Supplementary figure 4D-E). Next, we assessed the impact on the proportion of each cell type in the 6 AAV8 groups of mice (Figure 6C). As expected, hepatocytes and myeloid cells were the 2 largest cell clusters. Interestingly, pemafibrate strongly reduced the percentage of myeloid cells in the livers of AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> (25% in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> vs 11% in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>-pemafibrate) and tended to decrease this percentage in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> mice (19% in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> vs 14% in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>-pemafibrate), but not in AAV8-GFP mice (21% in AAV8-GFP vs 21% in AAV8-GFP-pemafibrate) (Figure 6C-D). Since PPAR $\alpha$  was exclusively restored in hepatocytes, we analyzed the hepatocyte cluster in detail, which allowed the identification of 7 subclusters (Figure 7A). We then focused on clusters whose presence depended on pemafibrate treatment. Interestingly, the hepato 6 cluster was only present in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> mice and especially in those treated with pemafibrate, but not in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> nor in AAV8-GFP mice (Figure 7B). Among the top 50 genes expressed in this hepato 6 cluster, classical PPAR $\alpha$  target genes involved in the metabolism and transport of fatty acids were found, such as *Cyp4a14*, *Ehhadh* (*Bien*), *Cd36*, *Fabp1* or *Slc27a1* (*Fatp1*) (Figure 7C, Supplementary data 2). Fast gene set enrichment analysis (fgSEA) using gene ontology biological process (GOBP) pathway annotations confirmed the enrichment of lipid metabolism-related pathways in this subcluster, illustrated by specific genes (Figure 7D, E). These results indicate that pemafibrate regulation

of genes implicated in lipid metabolism through transactivation was restricted to the hepatocytes in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>, but not in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> nor AAV8-GFP mice. By contrast, the hepato 5 cluster was strongly reduced by pemafibrate in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice (Figure 7B). Among the top 50 genes, this hepato 5 cluster mainly expressed inflammatory genes, such as APR proteins (*Saa1*, *Saa2*, *Lcn2*), chemokines (*Cxcl1*) and adhesion molecules (*Icam1*) (Figure 7C, supplementary data 2). The top 10 GOBP pathways in this hepato 5 cluster were related to regulation of immune response and cytokine production, characterizing this cluster as “pro-inflammatory hepatocytes” (Figure 7F) illustrated by specific inflammatory response genes whose expression was decreased by pemafibrate treatment in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice (Figure 7G). Thus, pemafibrate activation of the PPAR $\alpha$  transrepressive activity prevents the development of a pro-inflammatory hepatocyte phenotype, leading to lower expression of pro-inflammatory proteins and chemokines.

To evaluate how this improved hepatocyte inflammatory phenotype impacts immune cells, we next assessed neutrophils and myeloid cells clusters. In addition to the neutrophil cluster, myeloid cells could be divided into 5 subclusters (Figure 7H). Interestingly, pemafibrate reduced the myeloid 1 and myeloid 3 clusters as well as the neutrophil cluster in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice (Figure 7I). The myeloid 1 cluster was enriched in macrophage marker gene *Lgasl3* and the characteristic markers of lipid-associated macrophages (LAM) *Gpnmb*, *Mmp12* or *Trem2* (Figure 7J-K, Supplementary data 3). The myeloid 3 cluster expressed genes such as the monocyte/macrophage marker *Itgam*, the monocyte-recruitment chemokine receptors *Ccr2* and *Cx3cr1* known to induce monocyte and macrophage recruitment to sites of inflammation (Figure 7J-K, Supplementary data 3). The neutrophil cluster was enriched in the potent neutrophil chemoattractant *Cxcl2* and its receptor *Cxcr2*, and the pro-inflammatory cytokine *Il1b* (Figure 7J-K, Supplementary data 3). Altogether, these results suggest that the pemafibrate-induced reduction of inflammatory phenotype in hepatocytes results in fewer LAM, possibly

due to reduced *Ccr2*-mediated recruitment of blood monocytes and *Cxcr2*-mediated recruitment of neutrophils, and consequently less release of pro-inflammatory chemokines and cytokines, such as *Il1b*.

To characterize the consequences on atherosclerotic plaque inflammation, immunostaining of MOMA-2 (monocyte/macrophage marker) and VCAM-1 (chemoattractant protein) was performed within the atherosclerotic plaque near the area of maximum plaque burden (Figure 8A-F). MOMA-2 quantification revealed that pemafibrate reduced macrophage content in atherosclerotic lesions of AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> and AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>, but not AAV8-GFP mice (Figure 8A-B). In line with the lower number of macrophages, VCAM-1 expression was also significantly reduced in atherosclerotic lesions of pemafibrate-treated AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> and AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice (Figure 8C-D), suggesting that activation of hepatocyte PPAR $\alpha$  transrepressive activity by pemafibrate results in a distal reduction in VCAM-1 expression and hence likely the adhesion of monocytes to the atherosclerotic wall, thus limiting macrophage content and atherosclerosis development. Given the role of IL-1 $\beta$  in smooth muscle cell (SMC) proliferation and differentiation, immunostaining of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), a SMC marker, was also performed within the atherosclerotic plaque (Supplementary figure 5A). Quantitative assessment of  $\alpha$ -SMA indicated a significant reduction in  $\alpha$ -SMA-positive SMC content within the atherosclerotic plaque of AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> and AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice (Supplementary figure 5A,B).

Finally, plasma levels of IL-1 $\beta$ , a major atherogenic cytokine (43–51) whose hepatic expression level was significantly reduced in pemafibrate-treated AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> and AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice (Figure 3B and figure 7K), were decreased upon pemafibrate treatment in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> and AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice (Figure 8E). These data suggest that IL-1 $\beta$  may be the systemic link between reduced hepatic inflammation by pemafibrate and its distal atheroprotective effects (Figure 8F).

## DISCUSSION

Fibrates were considered as promising drugs for the management of residual CVD risk. Post-hoc analysis of the FIELD and ACCORD studies suggested that fenofibrate, alone or in association with a statin, reduces CVD risk in patients with marked dyslipidemia (hypertriglyceridemia and low HDL-C levels) (16–20, 52). However, in the recently reported PROMINENT trial, despite significant improvements of dyslipidemia, pemafibrate failed to show any beneficial effects on cardiovascular events in statin-treated diabetic patients with dyslipidemia (21). Since PPAR $\alpha$  exerts both lipid-lowering and anti-inflammatory effects, these findings raise the possibility that fibrates may exert cardioprotective actions through an improvement of inflammation rather than the dyslipidemic profiles used to enroll patients in the trial. In our study, we addressed the importance of anti-inflammatory vs hypolipidemic effects of PPAR $\alpha$  activation by pemafibrate, in a well-known mouse model of mixed dyslipidemia and atherosclerosis, the *Ldlr*-deficient mouse model (*Ldlr*<sup>-/-</sup>) under western diet to exacerbate dyslipidemia. We first demonstrated that pemafibrate induces a strong atheroprotective effect in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> (-50% of lesion surface), but not in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice. This was associated with a PPAR $\alpha$ -dependent pemafibrate-induced improvement of atherogenic dyslipidemia. Thus, as previously observed in the laboratory in *ApoE2KI* mice (30), pemafibrate induces atheroprotection also in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. These results are consistent with many previous preclinical mouse studies showing beneficial effects of different fibrates on atherosclerosis development (10–15).

Since pemafibrate induces a strong PPAR $\alpha$ -dependent atheroprotection in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice, we further evaluated metabolic and immune changes associated with these effects. Peripheral WBC counts and leukocytes subset distribution were unchanged upon pemafibrate treatment, indicating that pemafibrate did not modify the number of circulating blood cells, including monocytes. PPAR $\alpha$  is expressed in many metabolic organs, such as muscle, heart or intestine

as well as in many cell types of the atherosclerotic plaque. However, PPAR $\alpha$  is highly expressed in the liver and particularly in hepatocytes, where it exerts both metabolic and anti-inflammatory activities (5–9). Therefore, we determined the role of liver, and more specifically hepatocyte PPAR $\alpha$  to mediate the atheroprotective effects of pemafibrate. Interestingly, we found that selective expression of PPAR $\alpha^{\text{WT}}$  in the liver of *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice enabled pemafibrate to strongly decrease plasma TC and TG levels to a similar extent as in whole-body PPAR $\alpha$  expressing *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. This result demonstrates that hepatocyte PPAR $\alpha$  is required for pemafibrate's hypolipidemic effects. Moreover, pemafibrate also strongly reduces atherosclerosis development in AAV8-PPAR $\alpha^{\text{WT}}$  mice, to a similar extent as in whole-body PPAR $\alpha$  *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. Thus, even though PPAR $\alpha$  is expressed in many organs and atherosclerotic plaque cells, hepatocyte PPAR $\alpha$  appears to be largely responsible for the pemafibrate-induced atheroprotection in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. This result highlights the fact that a distal organ such as the liver can have a determining role on the development of atherosclerotic plaques, in line with previous preclinical studies (53–56). This study demonstrates the inter-organ crosstalk between the liver and the heart, with the hepatocytes being key in mediating the atheroprotective effects of pemafibrate in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.

Next, we determined the impact of hepatocyte anti-inflammatory PPAR $\alpha$  transrepressive activity on atherogenesis, using the PPAR $\alpha$  mutant, PPAR $\alpha^{\text{DISS}}$ . Surprisingly, in AAV8-PPAR $\alpha^{\text{DISS}}$ -reconstituted mice, pemafibrate reduces atherogenesis to the same extent as in AAV8-PPAR $\alpha^{\text{WT}}$ -reconstituted mice (-42%) despite an absence of modification of atherogenic dyslipidemia. Thus, hepatocyte PPAR $\alpha$  anti-inflammatory activity is sufficient to mediate pemafibrate-induced atheroprotection in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. This is in line with observations that inflammation triggers the early phases of atherogenesis (23), and high levels of inflammatory cytokines are associated with higher CVD risk (57). Thus, pemafibrate likely exerts its atheroprotective activity via the activation of hepatocyte PPAR $\alpha$  transrepressive activity

resulting in decreased hepatic inflammation, as indicated by reduced CD68-positive cells in the liver and reduced release of pro-inflammatory cytokines and chemokines. Interestingly, snRNA-seq performed on livers of the AAV8-reconstituted mice revealed a significant decrease in the proportion of myeloid cells in livers of pemafibrate-treated AAV8-PPAR $\alpha^{\text{DISS}}$  mice. Associated to this effect, pemafibrate also inhibited the pro-inflammatory state in hepatocytes through the reduction of the hepato 5 cluster. The existence of pro-inflammatory hepatocytes exerting immunoregulatory roles has already been described in the context of endotoxemia LPS-induced (58). By limiting the number of pro-inflammatory hepatocytes, pemafibrate - through PPAR $\alpha$  transrepressive activity - may reduce the recruitment and activation of leukocytes, especially LAM, inflammatory monocyte-derived macrophages and neutrophils, which all play an important role in hepatic inflammation(59). This leads to reduced expression of pro-inflammatory chemokines and cytokines, such as *Il-1 $\beta$* . Although we focused on the specific interaction between hepatocytes, myeloid cells and neutrophils, other cellular interactions within the liver microenvironment may also be critical in hepatic inflammation(59–61). Interestingly, plasma IL-1 $\beta$  levels were also significantly reduced in pemafibrate-treated AAV8-PPAR $\alpha^{\text{WT}}$  and AAV8-PPAR $\alpha^{\text{DISS}}$ -reconstituted mice. IL-1 $\beta$  is a potent inducer of VCAM-1 expression in atherosclerotic lesions(62). As decreases of VCAM-1 and MOMA-2 positive cells were also observed in the atherosclerotic plaque of the pemafibrate-treated AAV8-PPAR $\alpha^{\text{WT}}$  and AAV8-PPAR $\alpha^{\text{DISS}}$  mice, we hypothesize that, through hepatocyte PPAR $\alpha$  transrepressive activity, pemafibrate reduces hepatic inflammation by limiting the number of pro-inflammatory hepatocytes and inhibiting leukocyte recruitment and activation. This then leads to reduced plasma IL-1 $\beta$  and less VCAM-1-dependent recruitment and adhesion of monocytes to the atherosclerotic wall, thus reducing the number of macrophages within the plaque and the development of atherosclerosis (Figure 8F). The importance of inflammation management to reduce cardiovascular events independently of dyslipidemia was shown in the

Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcome (CANTOS) study in which targeting IL-1 $\beta$  using the specific monoclonal antibody canakinumab decreased recurrent cardiovascular events independent of lipid-lowering effects (43). Moreover, clinical trials with colchicine, a potent anti-inflammatory medication, demonstrated a beneficial effect on the prevention of cardiovascular events (63–65). Furthermore, several trials using NLRP3 antagonists and IL-6 inhibitors are ongoing (66–69). These findings identify new therapies targeting inflammation as promising to reduce CVD risk.

The results of our study and others (21, 70, 71) raise the question of the relevance of managing dyslipidemia, especially high TG and remnant cholesterol levels, to prevent residual CVD risk in patients on intensive statin treatment as in PROMINENT. Management of LDL-C remains the cornerstone in the management of CVD risk and LDL-lowering therapy with statin remains one of the most commonly used and effective treatments to reduce CVD risk (1, 72). Although several studies suggested that TG and remnant cholesterol management would decrease residual CVD risk (3), the results of our study in mice and the PROMINENT trial in humans suggest that this may not be the case. In line, the beneficial cardiovascular effects of eicosapentaenoic acid (EPA), a marine poly-unsaturated fatty acid (PUFA) with strong TG-lowering effects, also appear to occur independent of either baseline plasma TG levels or the TG-lowering response in the Reduction of Cardiovascular Events with Icosapent Ethyl-Intervention Trial (REDUCE-IT) (70, 73). The anti-inflammatory properties of EPA seem to be, among others, one of the important drivers of its cardioprotective effects (74, 75). Unfortunately, we could not determine the effect of hypolipidemic activity of PPAR $\alpha$  independent of its anti-inflammatory activity on atherosclerosis development in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice, since a PPAR $\alpha$  mutant exerting only PPAR $\alpha$  transactivation activity has not been identified.

Finally, although atherosclerotic plaque burden in mice is used as a surrogate for CVD events (as evaluated in trials like PROMINENT), the results of our study highlight the

importance of hepatic PPAR $\alpha$  anti-inflammatory activity in its cardioprotective effects, and allow us to propose some hypotheses behind the failure of the PROMINENT trial. Namely, selecting for patients with high residual inflammatory risk may provide optimal anti-CVD effects of PPAR $\alpha$  agonists in clinical practice. Moreover, it would be interesting to evaluate pemafibrate's effects on inflammatory parameters in the PROMINENT trial to assess its ability to regulate PPAR $\alpha$  transrepressive activity in humans. More generally, the transrepressive effect of the fibrate used and its anti-inflammatory effects are usually not considered in clinical trials assessing the impact of fibrates on CVD. This is particularly relevant since a recent analysis of the >30,000 patients of the PROMINENT, REDUCE-IT and STRENGTH trials identified inflammation (measured as plasma levels of C-reactive protein (CRP), a liver-produced inflammatory marker), but not LDL-cholesterol, as a predictor of future cardiovascular events and death in the optimally statin treated (baseline LDL-cholesterol between 70-80 mg/dl) patients enrolled in these studies (71). It is well-established that differences exist in terms of PPAR $\alpha$  specificity, potency and selectivity as well as hepatic cofactor recruitment between mice and humans and also between fibrates (76–78). This may result in distinct PPAR $\alpha$  biological responses including variable anti-inflammatory properties. Second, the expression of PPAR $\alpha$  in the liver of the PROMINENT subjects may be not sufficient for pemafibrate to induce its anti-inflammatory properties. Indeed, our previous results in *ApoE2KI* mice showed that *Ppara* gene levels differently affected the fibrate response on hepatic lipid metabolism, inflammation and atherosclerosis (15). Whereas a single *Ppara* allele is sufficient for an optimal response of lipid metabolism to fenofibrate, both alleles are required to obtain maximal anti-inflammatory effects in the liver and maximal atheroprotective effects. In the PROMINENT study, patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and elevated body mass index (BMI) were enrolled. Such patients display a high prevalence of metabolic dysfunction–associated liver disease (MASLD) (70%) and of metabolic dysfunction–associated

steatohepatitis (MASH) (33%) (79–81), and hepatic *PPARα* levels are decreased in MASLD patients (82). We hypothesize that diabetic patients in the PROMINENT trial express low hepatic *PPARα* levels, resulting in a lower induction of *PPARα* transrepressive activity by pemafibrate and a lower impact on inflammation. In our study, mice were submitted to a western diet, which induces only moderate liver damage with benign steatosis and mild inflammation, without overt MASH (83). It will be interesting to evaluate whether pemafibrate exerts any atheroprotective effects under conditions of more severe liver damage. Finally, the anti-inflammatory activities of statins have been shown to occur via *PPARα* (84, 85). Since PROMINENT patients are under intense statin treatment, it is possible that *PPARα* is already fully engaged in the control of the inflammatory parameters by the statins, precluding any further anti-inflammatory and cardioprotective properties of pemafibrate.

Altogether, our results demonstrate that hepatic anti-inflammation through *PPARα* transrepressive activity is sufficient for the anti-atherosclerotic effects of pemafibrate in *Ldlr<sup>-/-</sup>* mice. These observations suggest that mechanisms other than lipid-lowering are required for residual CVD risk management, and support the further development of agents targeting inflammation in the management of CVD risk.

## MATERIALS AND METHODS

### Study design

Homozygous *Ppara*-deficient mice on the C57BL/6J background (86) were crossed with homozygous *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice (87) to generate *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice either expressing *Ppara* (*Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup>) or not (*Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>). 8 week-old female mice of both genotypes were submitted to a western diet (21.2% fat, 48.5% carbohydrate, 17% protein) containing 0.2% cholesterol (Safe, Augy, France) supplemented (WD+P) or not (WD) with pemafibrate (MCE, Sweden) at a dose of 0.018g/kg of diet (roughly equivalent to 0.3 mpk) for 8 weeks. Mice were maintained under a 12-hour light/dark cycle and had free access to water. AAV8-TBG-GFP, AAV8-TBG-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> and AAV8-TBG-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> vectors were produced by Penn Vector Core (PA, USA). The 5'-tagged with 3 FLAG sequence motifs (3XFLAG) PPAR $\alpha$  coding DNA sequence was inserted into the pAAV2.1-TBG plasmid between NheI and BamHI restriction site. Female *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> were injected in the tail vein with 6 x 10<sup>11</sup> genome copies of AAV per mouse. This is a well-known technique described in the literature (38–40) and already tested in the lab (32, 88) to selectively target the hepatocytes in the liver. In this study, it enabled us to restore a significant hepatic expression of PPAR $\alpha$  in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice, which was only associated with hepatocytes (Supplementary figure 4). Three weeks after injection, mice were submitted to the same western diet as described above for 8 weeks. All experimental procedures were approved by the Hauts-de-France Regional Ethical committee (APAFIS# 29368-2020122211352298v4).

### Plasma lipid and lipoprotein analyses

Mice were fasted for 6 hours before retroorbital sinus puncture under isoflurane-induced anesthesia for plasma biochemical analysis. Plasma levels of TC, TG and HDL-C were measured by an enzymatic method using commercially available kits (Biolabo, FR). Non-HDL-C concentrations were calculated by subtracting HDL-C from TC levels. FFA levels were

measured using Konelab autoanalyzer (Thermo Scientific, USA). Lipoprotein fractions were separated and collected by FPLC performed on a Waters 2695 Acquity pump system with a Superose 6 10/300 GL gel filtration column (GE Healthcare, USA) and a Waters fraction collector III. TG and TC levels were measured in each fraction using the same kits as for total plasma. Plasma IL-1 $\beta$  concentrations were measured using the Mouse IL-1 $\beta$ /IL-1F2 High Sensitivity Quantikine® HS Elisa Kit (R&D Systems, USA).

### **RNA extraction and quantitative PCR analysis**

Total RNA was extracted from livers using TRIzol (ThermoFischer, USA). For quantitative PCR, equal quantities of RNA were reverse-transcribed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, USA) after DNase treatment according to the manufacturer's protocol. RNA levels were determined by real-time quantitative PCR on QuantStudio™ 3 Real-Time PCR system (ThermoFischer, USA). Gene expression levels were expressed normalized to cyclophilin.

### **Liver histology**

Paraffin-embedded liver sections (3  $\mu$ m) were stained with H&E. Steatosis and inflammation were scored at a 200-fold magnification according to Bedossa scoring (89) : steatosis <5%  $\rightarrow$  0; 5%–33%  $\rightarrow$  1; 33%–66%  $\rightarrow$  2; >66%  $\rightarrow$  3 ; no inflammatory foci  $\rightarrow$  0;  $\leq$ 2foci  $\rightarrow$  1; >2 foci  $\rightarrow$  2. For liver immunohistochemistry, frozen liver sections (5  $\mu$ m) were fixed in cold acetone (-20°C) and stained overnight with CD68 antibodies (MCA1957, dilution 1:100).

### **Atherosclerotic lesion analysis**

At the end of the diet, hearts were fixed in a solution of 4% glyoxal (pH 4-5). Serial 10- $\mu$ m-thick cryosections were cut between the valves and the aortic arch and atherosclerotic lesions were quantified after oil red O staining. Immunohistochemistry was performed using antibodies against MOMA-2 (MAB1852, dilution 1:400), VCAM-1 (MVCAM.A, dilution 1:400) and  $\alpha$ -

SMA (MAB1945, dilution 1:400). Images were captured and analyzed with the imaging software NIS-Elements.

### **Nuclei isolation and single nuclei-RNA sequencing (sn-RNAseq)**

To isolate nuclei, frozen livers from 3 mice randomly selected in each group were diced in NP40 lysis buffer (IGEPAL® I3021, Sigma-Aldrich, USA), dounce homogenized, and incubated on ice for 5 minutes. The homogenate was filtered using a 70- $\mu$ m cell strainer and then a 40- $\mu$ m cell strainer, and centrifuged for 5 minutes at 500 x g at 4°C. The supernatant was removed and the nuclei pellets were resuspended in wash buffer (1% bovine serum albumin, 0.2U/ $\mu$ L RNase inhibitor) and marked with Nuclear Pore Complex HTOs (Biolegend) to identify individual mice from each pool prior to FACS-purification using the dye SYTOX™ AADvanced™ (ThermoFischer, USA) to remove debris. Following collection, nuclei integrity was visually verified with Trypan blue staining and nuclei were counted.

Nuclei from individual mice were pooled at equal ratio prior to encapsulation. Encapsulation was performed using the 10X Chromium Controller using 3' GEMs kits v3.1 with groups run in separate lanes. Libraries were sequenced targeting ~25k reads/nuclei. After sequencing quality control, CellRanger v7.0.1 (10X Genomics, USA) was used to align reads to the mouse reference genome (mm10-2020-A reference obtained from 10X Genomics) and generate the counts matrix. The Seurat v.5 R package (Satija Lab) was used for further analysis of the raw counts. For quality control, nuclei expressing less than 200 and over 5000 genes were excluded as were nuclei with more than 5% mitochondrial genes. Quality control and pre-processing led to the identification of 122.616 total liver nuclei, including 27.648 from AAV8-PPAR $\alpha$ WT, 17.370 from AAV8-PPAR $\alpha$ WT-pemafibrate, 10.575 from AAV8-PPAR $\alpha$ DISS, 25.014 from AAV8-PPAR $\alpha$ DISS-pemafibrate, 14.531 from AAV8-GFP and 27.478 from

AAV8-GFP-pemafibrate. Unbiased analysis using the Seurat R package identified 19 cell clusters with a resolution of 0.5 (Supplementary figure 4A). The specific genes of each cluster were identified with the FindAllMarkers function with parameters `min.pct = 0.01`, `test.use = 'wilcox'`. Clusters were annotated according to cell type-specific genes, combined with marker genes from literature reports. Gene set enrichment analysis were performed using `fgsea` function and gene ontology biological process (GOBP) gene sets from the Mouse MSigDB collection.

### **Statistical analysis**

Statistical significance was determined using GraphPad Prism 9 software (GraphPad, USA). Differences between groups were compared by two-way ANOVA. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically different (indicated by \* for pemafibrate effect and § for genotype effect). Results are expressed as means  $\pm$  SEM.

## **SUPPLEMENTARY MATERIALS**

### **White blood cell count**

At the end of the 8-week western diet, mice were fasted for 6 hours before retroorbital sinus puncture under isoflurane-induced anesthesia. Blood levels of total white blood cells (WBC), neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils were measured using the ProCyte Dx Haematology Analyser (IDEXX Laboratories, USA).

### **Western-Blot analysis**

For protein extraction, liver samples were homogenized with RIPA assay buffer. Protein levels were determined using the BC assay protein quantitation kit (Interchim, FR). The samples migrated on a SDS-polyacrylamide 10% gel by electrophoresis and were transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. Membrane was incubated overnight at 4°C with

antibody against PPAR $\alpha$  (ab126285, Abcam, UK) and HSP90 $\alpha/\beta$  (K3720A, BioLegend, USA). Proteins were revealed and quantified by fluorescence with Odyssey CLx imaging system (LI-COR Biosciences, USA) with an image software (Image Studio<sup>TM</sup> Lite, LI-COR Biosciences, USA). PPAR $\alpha$  protein expression level was normalized to HSP90 expression level used as a loading control (n=3 pools/condition).

## REFERENCES

1. J. Borén, M. J. Chapman, R. M. Krauss, C. J. Packard, J. F. Bentzon, C. J. Binder, M. J. Daemen, L. L. Demer, R. A. Hegele, S. J. Nicholls, B. G. Nordestgaard, G. F. Watts, E. Bruckert, S. Fazio, B. A. Ference, I. Graham, J. D. Horton, U. Landmesser, U. Laufs, L. Masana, G. Pasterkamp, F. J. Raal, K. K. Ray, H. Schunkert, M.-R. Taskinen, B. van de Sluis, O. Wiklund, L. Tokgozoglu, A. L. Catapano, H. N. Ginsberg, Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* **41**, 2313–2330 (2020).
2. U. K. Sampson, S. Fazio, M. F. Linton, Residual cardiovascular risk despite optimal LDL cholesterol reduction with statins: the evidence, etiology, and therapeutic challenges. *Curr Atheroscler Rep* **14**, 1–10 (2012).
3. H. N. Ginsberg, C. J. Packard, M. J. Chapman, J. Borén, C. A. Aguilar-Salinas, M. Averna, B. A. Ference, D. Gaudet, R. A. Hegele, S. Kersten, G. F. Lewis, A. H. Lichtenstein, P. Moulin, B. G. Nordestgaard, A. T. Remaley, B. Staels, E. S. G. Stroes, M.-R. Taskinen, L. S. Tokgözoğlu, A. Tybjaerg-Hansen, J. K. Stock, A. L. Catapano, Triglyceride-rich lipoproteins and their remnants: metabolic insights, role in atherosclerotic cardiovascular disease, and emerging therapeutic strategies—a consensus statement from the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* **42**, 4791–4806 (2021).
4. B. Staels, J. Dallongeville, J. Auwerx, K. Schoonjans, E. Leitersdorf, J. C. Fruchart, Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* **98**, 2088–2093 (1998).
5. O. Braissant, F. Fougère, C. Scotto, M. Dauça, W. Wahli, Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$  in the adult rat. *Endocrinology* **137**, 354–366 (1996).
6. Tabula Muris Consortium, Overall coordination, Logistical coordination, Organ collection and processing, Library preparation and sequencing, Computational data analysis, Cell type annotation, Writing group, Supplemental text writing group, Principal investigators, Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. *Nature* **562**, 367–372 (2018).
7. P. Lefebvre, G. Chinetti, J.-C. Fruchart, B. Staels, Sorting out the roles of PPAR  $\alpha$  in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* **116**, 571–580 (2006).

8. M. Pawlak, P. Lefebvre, B. Staels, Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* **62**, 720–733 (2015).
9. N. Bougarne, B. Weyers, S. J. Desmet, J. Deckers, D. W. Ray, B. Staels, K. De Bosscher, Molecular Actions of PPAR $\alpha$  in Lipid Metabolism and Inflammation. *Endocr Rev* **39**, 760–802 (2018).
10. H. Duez, Y.-S. Chao, M. Hernandez, G. Torpier, P. Poulain, S. Mundt, Z. Mallat, E. Teissier, C. A. Burton, A. Tedgui, J.-C. Fruchart, C. Fiévet, S. D. Wright, B. Staels, Reduction of atherosclerosis by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate in mice. *J Biol Chem* **277**, 48051–48057 (2002).
11. A. C. Li, C. J. Binder, A. Gutierrez, K. K. Brown, C. R. Plotkin, J. W. Pattison, A. F. Valledor, R. A. Davis, T. M. Willson, J. L. Witztum, W. Palinski, C. K. Glass, Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest* **114**, 1564–1576 (2004).
12. R. A. K. Srivastava, R. Jahagirdar, S. Azhar, S. Sharma, C. L. Bisgaier, Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha selective ligand reduces adiposity, improves insulin sensitivity and inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Mol Cell Biochem* **285**, 35–50 (2006).
13. T. Kooistra, L. Verschuren, J. de Vries-van der Weij, W. Koenig, K. Toet, H. M. G. Princen, R. Kleemann, Fenofibrate reduces atherogenesis in ApoE\*3Leiden mice: evidence for multiple antiatherogenic effects besides lowering plasma cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 2322–2330 (2006).
14. T. Inaba, H. Yagyu, N. Itabashi, F. Tazoe, N. Fujita, S. Nagashima, K. Okada, M. Okazaki, Y. Furukawa, S. Ishibashi, Cholesterol reduction and atherosclerosis inhibition by bezafibrate in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Hypertens Res* **31**, 999–1005 (2008).
15. F. Lalloyer, K. Wouters, M. Baron, S. Caron, E. Vallez, J. Vanhoutte, E. Baugé, R. Shiri-Sverdlov, M. Hofker, B. Staels, A. Tailleux, Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene level differently affects lipid metabolism and inflammation in apolipoprotein E2 knock-in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 1573–1579 (2011).
16. A. Keech, R. J. Simes, P. Barter, J. Best, R. Scott, M. R. Taskinen, P. Forder, A. Pillai, T. Davis, P. Glasziou, P. Drury, Y. A. Kesäniemi, D. Sullivan, D. Hunt, P. Colman, M. d’Emden, M. Whiting, C. Ehnholm, M. Laakso, FIELD study investigators, Effects of long-term

fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet* **366**, 1849–1861 (2005).

17. R. Scott, R. O'Brien, G. Fulcher, C. Pardy, M. D'Emden, D. Tse, M.-R. Taskinen, C. Ehnholm, A. Keech, Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) Study Investigators, Effects of fenofibrate treatment on cardiovascular disease risk in 9,795 individuals with type 2 diabetes and various components of the metabolic syndrome: the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study. *Diabetes Care* **32**, 493–498 (2009).

18. ACCORD Study Group, H. N. Ginsberg, M. B. Elam, L. C. Lovato, J. R. Crouse, L. A. Leiter, P. Linz, W. T. Friedewald, J. B. Buse, H. C. Gerstein, J. Probstfield, R. H. Grimm, F. Ismail-Beigi, J. T. Bigger, D. C. Goff, W. C. Cushman, D. G. Simons-Morton, R. P. Byington, Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* **362**, 1563–1574 (2010).

19. M. Elam, L. Lovato, H. Ginsberg, The ACCORD-Lipid study: implications for treatment of dyslipidemia in Type 2 diabetes mellitus. *Clin Lipidol* **6**, 9–20 (2011).

20. M. B. Elam, H. N. Ginsberg, L. C. Lovato, M. Corson, J. Largay, L. A. Leiter, C. Lopez, P. J. O'Connor, M. E. Sweeney, D. Weiss, W. T. Friedewald, J. B. Buse, H. C. Gerstein, J. Probstfield, R. Grimm, F. Ismail-Beigi, D. C. Goff, J. L. Fleg, Y. Rosenberg, R. P. Byington, ACCORDION Study Investigators, Association of Fenofibrate Therapy With Long-term Cardiovascular Risk in Statin-Treated Patients With Type 2 Diabetes. *JAMA Cardiol* **2**, 370–380 (2017).

21. A. Das Pradhan, R. J. Glynn, J.-C. Fruchart, J. G. MacFadyen, E. S. Zaharris, B. M. Everett, S. E. Campbell, R. Oshima, P. Amarengo, D. J. Blom, E. A. Brinton, R. H. Eckel, M. B. Elam, J. S. Felicio, H. N. Ginsberg, A. Goudev, S. Ishibashi, J. Joseph, T. Kodama, W. Koenig, L. A. Leiter, A. J. Lorenzatti, B. Mankovsky, N. Marx, B. G. Nordestgaard, D. Páll, K. K. Ray, R. D. Santos, H. Soran, A. Susekov, M. Tendera, K. Yokote, N. P. Paynter, J. E. Buring, P. Libby, P. M. Ridker, PROMINENT Investigators, Triglyceride Lowering with Pemafibrate to Reduce Cardiovascular Risk. *N Engl J Med* (2022), doi:10.1056/NEJMoa2210645.

22. M. L. Morieri, H. S. Shah, J. Sjaarda, P. A. Lenzini, H. Campbell, A. A. Motsinger-Reif, H. Gao, L. Lovato, S. Prudente, A. Pandolfi, M. G. Pezzolesi, R. J. Sigal, G. Paré, S. M. Marcovina, D. M. Rotroff, E. Patorno, L. Mercuri, V. Trischitta, E. Y. Chew, P. Kraft, J. B. Buse, M. J. Wagner, S. Cresci, H. C. Gerstein, H. N. Ginsberg, J. C. Mychaleckyj, A. Doria, PPARA

Polymorphism Influences the Cardiovascular Benefit of Fenofibrate in Type 2 Diabetes: Findings From ACCORD-Lipid. *Diabetes* **69**, 771–783 (2020).

23. O. Soehnlein, P. Libby, Targeting inflammation in atherosclerosis - from experimental insights to the clinic. *Nat Rev Drug Discov* **20**, 589–610 (2021).

24. P. Libby, Inflammation in Atherosclerosis—No Longer a Theory. *Clinical Chemistry* **67**, 131–142 (2021).

25. S. Ishibashi, S. Yamashita, H. Arai, E. Araki, K. Yokote, H. Suganami, J.-C. Fruchart, T. Kodama, K-877-04 Study Group, Effects of K-877, a novel selective PPAR $\alpha$  modulator (SPPARM $\alpha$ ), in dyslipidaemic patients: A randomized, double blind, active- and placebo-controlled, phase 2 trial. *Atherosclerosis* **249**, 36–43 (2016).

26. H. Arai, S. Yamashita, K. Yokote, E. Araki, H. Suganami, S. Ishibashi, K-877 Study Group, Efficacy and safety of K-877, a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  modulator (SPPARM $\alpha$ ), in combination with statin treatment: Two randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trials in patients with dyslipidaemia. *Atherosclerosis* **261**, 144–152 (2017).

27. H. Arai, S. Yamashita, K. Yokote, E. Araki, H. Suganami, S. Ishibashi, K-877 Study Group, Efficacy and Safety of Pemafibrate Versus Fenofibrate in Patients with High Triglyceride and Low HDL Cholesterol Levels: A Multicenter, Placebo-Controlled, Double-Blind, Randomized Trial. *J Atheroscler Thromb* **25**, 521–538 (2018).

28. S. Ishibashi, H. Arai, K. Yokote, E. Araki, H. Suganami, S. Yamashita, K-877 Study Group, Efficacy and safety of pemafibrate (K-877), a selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  modulator, in patients with dyslipidemia: Results from a 24-week, randomized, double blind, active-controlled, phase 3 trial. *J Clin Lipidol* **12**, 173–184 (2018).

29. H. N. Ginsberg, N. J. Hounslow, Y. Senko, H. Suganami, P. Bogdanski, R. Ceska, A. Kalina, R. A. Libis, T. V. Supryadkina, G. K. Hovingh, Efficacy and Safety of K-877 (Pemafibrate), a Selective PPAR $\alpha$  Modulator, in European Patients on Statin Therapy. *Diabetes Care* **45**, 898–908 (2022).

30. N. Hennyer, I. Duplan, C. Paquet, J. Vanhoutte, E. Woitrain, V. Touche, S. Colin, E. Vallez, S. Lestavel, P. Lefebvre, B. Staels, The novel selective PPAR $\alpha$  modulator (SPPARM $\alpha$ ) pemafibrate improves dyslipidemia, enhances reverse cholesterol transport and decreases inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **249**, 200–208 (2016).

31. H. Konishi, K. Miyauchi, A. Onishi, S. Suzuki, D. Fuchimoto, J. Shitara, H. Endo, H. Wada, S. Doi, R. Naito, M. Ogita, T. Dohi, T. Kasai, H. Daida, Effect of pemafibrate (K-877),

a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  modular (SPPARM $\alpha$ ), in atherosclerosis model using low density lipoprotein receptor knock-out swine with balloon injury. *PLoS One* **15**, e0241195 (2020).

32. M. Pawlak, E. Baugé, W. Bourguet, K. De Bosscher, F. Lalloyer, A. Tailleux, C. Leberherz, P. Lefebvre, B. Staels, The transrepressive activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is necessary and sufficient to prevent liver fibrosis in mice. *Hepatology* **60**, 1593–1606 (2014).

33. C. Lassale, A. Curtis, I. Abete, Y. T. van der Schouw, W. M. M. Verschuren, Y. Lu, H. B. A. Bueno-de-Mesquita, Elements of the complete blood count associated with cardiovascular disease incidence: Findings from the EPIC-NL cohort study. *Sci Rep* **8**, 3290 (2018).

34. Y. Gao, W. Shen, B. Lu, Q. Zhang, Y. Hu, Y. Chen, Upregulation of hepatic VLDLR via PPAR $\alpha$  is required for the triglyceride-lowering effect of fenofibrate. *J Lipid Res* **55**, 1622–1633 (2014).

35. M. A. Abdelmegeed, S.-H. Yoo, L. E. Henderson, F. J. Gonzalez, K. J. Woodcroft, B.-J. Song, PPARalpha expression protects male mice from high fat-induced nonalcoholic fatty liver. *J Nutr* **141**, 603–610 (2011).

36. A. Montagner, A. Polizzi, E. Fouché, S. Ducheix, Y. Lippi, F. Lasserre, V. Barquissau, M. Régnier, C. Lukowicz, F. Benhamed, A. Iroz, J. Bertrand-Michel, T. Al Saati, P. Cano, L. Mselli-Lakhal, G. Mithieux, F. Rajas, S. Lagarrigue, T. Pineau, N. Loiseau, C. Postic, D. Langin, W. Wahli, H. Guillou, Liver PPAR $\alpha$  is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* **65**, 1202–1214 (2016).

37. M. Régnier, A. Polizzi, S. Smati, C. Lukowicz, A. Fougerat, Y. Lippi, E. Fouché, F. Lasserre, C. Naylies, C. Bétoulières, V. Barquissau, E. Mouisel, J. Bertrand-Michel, A. Batut, T. A. Saati, C. Canlet, M. Tremblay-Franco, S. Ellero-Simatos, D. Langin, C. Postic, W. Wahli, N. Loiseau, H. Guillou, A. Montagner, Hepatocyte-specific deletion of Ppar $\alpha$  promotes NAFLD in the context of obesity. *Sci Rep* **10**, 6489 (2020).

38. H. Nakai, S. Fuess, T. A. Storm, S. Muramatsu, Y. Nara, M. A. Kay, Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol* **79**, 214–224 (2005).

39. S.-J. Chen, J. Sanmiguel, M. Lock, D. McMenemy, C. Draper, M. P. Limberis, S. H. Kassim, S. Somanathan, P. Bell, J. C. Johnston, D. J. Rader, J. M. Wilson, Biodistribution of AAV8 vectors expressing human low-density lipoprotein receptor in a mouse model of homozygous familial hypercholesterolemia. *Hum Gene Ther Clin Dev* **24**, 154–160 (2013).

40. C. Kiourtis, A. Wilczynska, C. Nixon, W. Clark, S. May, T. G. Bird, Specificity and off-target effects of AAV8-TBG viral vectors for the manipulation of hepatocellular gene expression in mice. *Biol Open* **10**, bio058678 (2021).
41. C. N. Brocker, D. P. Patel, T. J. Velenosi, D. Kim, T. Yan, J. Yue, G. Li, K. W. Krausz, F. J. Gonzalez, Extrahepatic PPAR $\alpha$  modulates fatty acid oxidation and attenuates fasting-induced hepatosteatosis in mice. *J Lipid Res* **59**, 2140–2152 (2018).
42. F. Mach, C. Baigent, A. L. Catapano, K. C. Koskinas, M. Casula, L. Badimon, M. J. Chapman, G. G. De Backer, V. Delgado, B. A. Ference, I. M. Graham, A. Halliday, U. Landmesser, B. Mihaylova, T. R. Pedersen, G. Riccardi, D. J. Richter, M. S. Sabatine, M.-R. Taskinen, L. Tokgozoglul, O. Wiklund, ESC Scientific Document Group, 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J* **41**, 111–188 (2020).
43. P. M. Ridker, B. M. Everett, T. Thuren, J. G. MacFadyen, W. H. Chang, C. Ballantyne, F. Fonseca, J. Nicolau, W. Koenig, S. D. Anker, J. J. P. Kastelein, J. H. Cornel, P. Pais, D. Pella, J. Genest, R. Cifkova, A. Lorenzatti, T. Forster, Z. Kobalava, L. Vida-Simiti, M. Flather, H. Shimokawa, H. Ogawa, M. Dellborg, P. R. F. Rossi, R. P. T. Troquay, P. Libby, R. J. Glynn, CANTOS Trial Group, Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* **377**, 1119–1131 (2017).
44. A. Abbate, S. Toldo, C. Marchetti, J. Kron, B. W. Van Tassell, C. A. Dinarello, Interleukin-1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Circ Res* **126**, 1260–1280 (2020).
45. P. Libby, Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond. *J Am Coll Cardiol* **70**, 2278–2289 (2017).
46. H. Chi, E. Messas, R. A. Levine, D. T. Graves, S. Amar, Interleukin-1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated with bacterial exposure and/or a high-fat diet in a murine apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic implications. *Circulation* **110**, 1678–1685 (2004).
47. D. Gomez, R. A. Baylis, B. G. Durgin, A. A. C. Newman, G. F. Alencar, S. Mahan, C. St Hilaire, W. Müller, A. Waisman, S. E. Francis, E. Pinteaux, G. J. Randolph, H. Gram, G. K. Owens, Interleukin-1 $\beta$  has atheroprotective effects in advanced atherosclerotic lesions of mice. *Nat Med* **24**, 1418–1429 (2018).
48. J. Hettwer, J. Hinterdobler, B. Miritsch, M.-A. Deutsch, X. Li, C. Mauersberger, A. Moggio, Q. Braster, H. Gram, A. A. B. Robertson, M. A. Cooper, O. Groß, M. Krane, C. Weber,

W. Koenig, O. Soehnlein, N. H. Adamstein, P. Ridker, H. Schunkert, P. Libby, T. Kessler, H. B. Sager, Interleukin-1 $\beta$  suppression dampens inflammatory leucocyte production and uptake in atherosclerosis. *Cardiovascular Research* **118**, 2778–2791 (2022).

49. H. Kirii, T. Niwa, Y. Yamada, H. Wada, K. Saito, Y. Iwakura, M. Asano, H. Moriwaki, M. Seishima, Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 656–660 (2003).

50. V. Bhaskar, J. Yin, A. M. Mirza, D. Phan, S. Vanegas, H. Issafras, K. Michelson, J. J. Hunter, S. S. Kantak, Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis in vitro and inhibit atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* **216**, 313–320 (2011).

51. W. Mai, Y. Liao, Targeting IL-1 $\beta$  in the Treatment of Atherosclerosis. *Front Immunol* **11**, 589654 (2020).

52. B. Staels, M. Maes, A. Zambon, Fibrates and future PPARalpha agonists in the treatment of cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **5**, 542–553 (2008).

53. R. Mansouri, B. E. P. Gervois, J. Fruchart-Najib, C. Fiévet, B. Staels, J.-C. Fruchart, Atheroprotective effect of human apolipoprotein A5 in a mouse model of mixed dyslipidemia. *Circulation research* **103** (2008), doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.179861.

54. A. C. Calkin, S. D. Lee, J. Kim, C. M. W. Van Stijn, X.-H. Wu, A. J. Lusis, C. Hong, R. I. Tangirala, P. Tontonoz, Transgenic expression of dominant-active IDOL in liver causes diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in mice. *Circ Res* **115**, 442–449 (2014).

55. K. Kitajima, D. H. L. Marchadier, G. C. Miller, G. Gao, J. M. Wilson, D. J. Rader, Complete prevention of atherosclerosis in apoE-deficient mice by hepatic human apoE gene transfer with adeno-associated virus serotypes 7 and 8. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1852–1857 (2006).

56. S. H. Kassim, H. Li, L. H. Vandenberghe, C. Hinderer, P. Bell, D. Marchadier, A. Wilson, D. Cromley, V. Redon, H. Yu, J. M. Wilson, D. J. Rader, Gene therapy in a humanized mouse model of familial hypercholesterolemia leads to marked regression of atherosclerosis. *PLoS One* **5**, e13424 (2010).

57. D. P. Ramji, T. S. Davies, Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev* **26**, 673–685 (2015).

58. X. Sun, J. Wu, L. Liu, Y. Chen, Y. Tang, S. Liu, H. Chen, Y. Jiang, Y. Liu, H. Yuan, Y. Lu, Z. Chen, J. Cai, Transcriptional switch of hepatocytes initiates macrophage recruitment and T-cell suppression in endotoxemia. *J Hepatol* **77**, 436–452 (2022).

59. J. A. Hoogerland, B. Staels, D. Dombrowicz, Immune-metabolic interactions in homeostasis and the progression to NASH. *Trends Endocrinol Metab* **33**, 690–709 (2022).
60. S. J. Wallace, F. Tacke, R. F. Schwabe, N. C. Henderson, Understanding the cellular interactome of non-alcoholic fatty liver disease. *JHEP Rep* **4**, 100524 (2022).
61. J. Gong, W. Tu, J. Liu, D. Tian, Hepatocytes: A key role in liver inflammation. *Front Immunol* **13**, 1083780 (2022).
62. X. Wang, G. Z. Feuerstein, J. L. Gu, P. G. Lysko, T. L. Yue, Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **115**, 89–98 (1995).
63. S. M. Nidorf, J. W. Eikelboom, C. A. Budgeon, P. L. Thompson, Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* **61**, 404–410 (2013).
64. J.-C. Tardif, S. Kouz, D. D. Waters, O. F. Bertrand, R. Diaz, A. P. Maggioni, F. J. Pinto, R. Ibrahim, H. Gamra, G. S. Kiwan, C. Berry, J. López-Sendón, P. Ostadal, W. Koenig, D. Angoulvant, J. C. Grégoire, M.-A. Lavoie, M.-P. Dubé, D. Rhainds, M. Provencher, L. Blondeau, A. Orfanos, P. L. L’Allier, M.-C. Guertin, F. Roubille, Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* **381**, 2497–2505 (2019).
65. S. M. Nidorf, A. T. L. Fiolet, A. Mosterd, J. W. Eikelboom, A. Schut, T. S. J. Opstal, S. H. K. The, X.-F. Xu, M. A. Ireland, T. Lenderink, D. Latchem, P. Hoogslag, A. Jerzewski, P. Nierop, A. Whelan, R. Hendriks, H. Swart, J. Schaap, A. F. M. Kuijper, M. W. J. van Hessen, P. Saklani, I. Tan, A. G. Thompson, A. Morton, C. Judkins, W. A. Bax, M. Dirksen, M. Alings, G. J. Hankey, C. A. Budgeon, J. G. P. Tijssen, J. H. Cornel, P. L. Thompson, LoDoCo2 Trial Investigators, Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *N Engl J Med* **383**, 1838–1847 (2020).
66. K. Broch, A. K. Anstensrud, S. Woxholt, K. Sharma, I. M. Tøllefsen, B. Bendz, S. Aakhus, T. Ueland, B. H. Amundsen, J. K. Damås, E. S. Berg, E. Bjørkelund, C. Bendz, E. Hopp, O. Kleveland, K. H. Stensæth, A. Opdahl, N.-E. Kløw, I. Seljeflot, G. Ø. Andersen, R. Wiseth, P. Aukrust, L. Gullestad, Randomized Trial of Interleukin-6 Receptor Inhibition in Patients With Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* **77**, 1845–1855 (2021).
67. P. M. Ridker, M. Devalaraja, F. M. M. Baeres, M. D. M. Engelmann, G. K. Hovingh, M. Ivkovic, L. Lo, D. Kling, P. Pergola, D. Raj, P. Libby, M. Davidson, RESCUE Investigators, IL-6 inhibition with ziltivekimab in patients at high atherosclerotic risk (RESCUE): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* **397**, 2060–2069 (2021).

68. S. Toldo, A. Abbate, The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol* **15**, 203–214 (2018).
69. P. M. Ridker, M. Rane, Interleukin-6 Signaling and Anti-Interleukin-6 Therapeutics in Cardiovascular Disease. *Circ Res* **128**, 1728–1746 (2021).
70. D. L. Bhatt, P. G. Steg, M. Miller, E. A. Brinton, T. A. Jacobson, S. B. Ketchum, R. T. Doyle, R. A. Juliano, L. Jiao, C. Granowitz, J.-C. Tardif, J. Gregson, S. J. Pocock, C. M. Ballantyne, REDUCE-IT Investigators, Effects of Icosapent Ethyl on Total Ischemic Events: From REDUCE-IT. *J Am Coll Cardiol* **73**, 2791–2802 (2019).
71. P. M. Ridker, D. L. Bhatt, A. D. Pradhan, R. J. Glynn, J. G. MacFadyen, S. E. Nissen, Inflammation and cholesterol as predictors of cardiovascular events among patients receiving statin therapy: a collaborative analysis of three randomised trials. *The Lancet* (2023), doi:10.1016/S0140-6736(23)00215-5.
72. R. Chou, A. Cantor, T. Dana, J. Wagner, A. Y. Ahmed, R. Fu, M. Ferencik, Statin Use for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease in Adults: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA* **328**, 754–771 (2022).
73. D. L. Bhatt, P. G. Steg, M. Miller, E. A. Brinton, T. A. Jacobson, S. B. Ketchum, R. T. Doyle, R. A. Juliano, L. Jiao, C. Granowitz, J.-C. Tardif, C. M. Ballantyne, REDUCE-IT Investigators, Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med* **380**, 11–22 (2019).
74. R. P. Mason, P. Libby, D. L. Bhatt, Emerging Mechanisms of Cardiovascular Protection for the Omega-3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **40** (2020), doi:10.1161/ATVBAHA.119.313286.
75. S. C. R. Sherratt, P. Libby, M. J. Budoff, D. L. Bhatt, R. P. Mason, Role of Omega-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease: the Debate Continues. *Current atherosclerosis reports* **25** (2023), doi:10.1007/s11883-022-01075-x.
76. T. M. Willson, P. J. Brown, D. D. Sternbach, B. R. Henke, The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* **43**, 527–550 (2000).
77. F. J. Gonzalez, Y. M. Shah, PPARalpha: mechanism of species differences and hepatocarcinogenesis of peroxisome proliferators. *Toxicology* **246**, 2–8 (2008).
78. S. Yamashita, D. Masuda, Y. Matsuzawa, Clinical Applications of a Novel Selective PPAR $\alpha$  Modulator, Pemafibrate, in Dyslipidemia and Metabolic Diseases. *J Atheroscler Thromb* **26**, 389–402 (2019).

79. J. Quek, K. E. Chan, Z. Y. Wong, C. Tan, B. Tan, W. H. Lim, D. J. H. Tan, A. S. P. Tang, P. Tay, J. Xiao, J. N. Yong, R. W. Zeng, N. W. S. Chew, B. Nah, A. Kulkarni, M. S. Siddiqui, Y. Y. Dan, V. W.-S. Wong, A. J. Sanyal, M. Noureddin, M. Muthiah, C. H. Ng, Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in the overweight and obese population: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **8**, 20–30 (2023).

80. M. E. Rinella, J. V. Lazarus, V. Ratziu, S. M. Francque, A. J. Sanyal, F. Kanwal, D. Romero, M. F. Abdelmalek, Q. M. Anstee, J. P. Arab, M. Arrese, R. Bataller, U. Beuers, J. Boursier, E. Bugianesi, C. Byrne, G. E. Castro Narro, A. Chowdhury, H. Cortez-Pinto, D. Cryer, K. Cusi, M. El-Kassas, S. Klein, W. Eskridge, J. Fan, S. Gawrieh, C. D. Guy, S. A. Harrison, S. U. Kim, B. Koot, M. Korenjak, K. Kowdley, F. Lacaille, R. Loomba, R. Mitchell-Thain, T. R. Morgan, E. Powell, M. Roden, M. Romero-Gómez, M. Silva, S. P. Singh, S. C. Sookoian, C. W. Spearman, D. Tiniakos, L. Valenti, M. B. Vos, V. Wai-Sun Wong, S. Xanthakos, Y. Yilmaz, Z. Younossi, A. Hobbs, M. Villota-Rivas, P. N. Newsome, NAFLD Nomenclature consensus group, A multi-society Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *J Hepatol* , S0168-8278(23)00418-X (2023).

81. N. Mittal, H. Siddiqi, E. Madamba, L. Richards, R. Bettencourt, V. Ajmera, R. Loomba, A prospective study on the prevalence of at-risk MASH in patients with type 2 diabetes mellitus in the United States. *Aliment Pharmacol Ther* (2024), doi:10.1111/apt.17997.

82. S. M. Francque, D. van der Graaff, W. J. Kwanten, Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *J Hepatol* **65**, 425–443 (2016).

83. S. Smati, A. Polizzi, A. Fougerat, S. Ellero-Simatos, Y. Blum, Y. Lippi, M. Régnier, A. Laroyenne, M. Huillet, M. Arif, C. Zhang, F. Lasserre, A. Marrot, T. Al Saati, J. Wan, C. Sommer, C. Naylies, A. Batut, C. Lukowicz, T. Fougeray, B. Tramunt, P. Dubot, L. Smith, J. Bertrand-Michel, N. Hennuyer, J.-P. Pradere, B. Staels, R. Burcelin, F. Lenfant, J.-F. Arnal, T. Levade, L. Gamet-Payrastre, S. Lagarrigue, N. Loiseau, S. Lotersztajn, C. Postic, W. Wahli, C. Bureau, M. Guillaume, A. Mardinoglu, A. Montagner, P. Gourdy, H. Guillou, Integrative study of diet-induced mouse models of NAFLD identifies PPAR $\alpha$  as a sexually dimorphic drug target. *Gut* **71**, 807–821 (2022).

84. R. Paumelle, C. Blanquart, O. Briand, O. Barbier, C. Duhem, G. Woerly, F. Percevault, J.-C. Fruchart, D. Dombrowicz, C. Glineur, B. Staels, Acute antiinflammatory properties of

statins involve peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  via inhibition of the protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* **98**, 361–369 (2006).

85. R. Paumelle, B. Staels, Peroxisome proliferator-activated receptors mediate pleiotropic actions of statins. *Circ Res* **100**, 1394–1395 (2007).

86. S. S. Lee, T. Pineau, J. Drago, E. J. Lee, J. W. Owens, D. L. Kroetz, P. M. Fernandez-Salguero, H. Westphal, F. J. Gonzalez, Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* **15**, 3012–3022 (1995).

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

88. P. Lefebvre, F. Lalloyer, E. Baugé, M. Pawlak, C. Gheeraert, H. Dehondt, J. Vanhoutte, E. Woitrain, N. Hennuyer, C. Mazuy, M. Bobowski-Gérard, F. P. Zummo, B. Derudas, A. Driessen, G. Hubens, L. Vonghia, W. J. Kwanten, P. Michielsen, T. Vanwollegem, J. Eeckhoute, A. Verrijken, L. Van Gaal, S. Francque, B. Staels, Interspecies NASH disease activity whole-genome profiling identifies a fibrogenic role of PPAR $\alpha$ -regulated dermatopontin. *JCI Insight* **2**, 92264 (2017).

89. P. Bedossa, C. Poitou, N. Veyrie, J.-L. Bouillot, A. Basdevant, V. Paradis, J. Tordjman, K. Clement, Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* **56**, 1751–1759 (2012).

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Sébastien Fleury for technical assistance in histology.

## FUNDING

This work was supported by grants from Fédération Française de Cardiologie, Fondation de France, Agence Nationale pour la Recherche (EGID, ANR-10-LABX-0046 and PreciNASH ANR-16-RHUS-0006), the European Union (HEPADIP FP6 LSHM-CT-2005-018734 and RESOLVE FP7-305707), Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe labellisée FRM EQU202203014650), an ERC Advanced Grant (no. 694717) to BS and ERC Starting Grant (no. 101042759) to JTH.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

DH, EB, PL, BS and FL contributed to the conception and the design of the research study. DH, EB, NH, BD, EV, AD, JTH, KO and FL conducted experiments, acquired and analyzed the data. DH, EB, BS and FL wrote the manuscript. All the authors have read and approved the submission of the manuscript.

## **COMPETING INTERESTS**

The authors have declared that no conflict of interest exists.

## **DATA AVAILABILITY**

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

## FIGURES

**FIGURE 1: Pemafibrate reduces atherosclerotic lesions in a PPAR $\alpha$ -dependent manner in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.** (A) Representative histological sections of aortic sinus stained with oil red O and counterstained with hematoxylin. Magnification x40. Scale bar 100  $\mu$ m. (B) Surface of atherosclerotic lesion in  $\mu$ m<sup>2</sup> from the beginning of aortic valve to ventricle. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. (C) Quantification of atherosclerotic lesion area through the aortic sinus. Each point represents the mean lesion area ( $\pm$  SEM) determined at a specific distance from the aortic sinus. Mice were submitted to a western diet supplemented (+) or not (-) by pemafibrate during 8 weeks. WD=western diet; WD+P= western diet + pemafibrate. \*pemafibrate effect; <sup>s</sup>genotype effect. <sup>ss</sup>p<0.01; \*\*\*p<0.001.

**FIGURE 2: Pemafibrate improves atherogenic dyslipidemia as well as hepatic inflammation and lipid metabolism in a PPAR $\alpha$ -dependent manner in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.** (A) Plasma levels of TG at the end of western diet in each group. (B) Plasma lipid profiles of TG determined by FPLC in pooled plasma of *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mice and *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice at the end of diet. Plasma levels of (C) TC, (D) HDL-C and (E) non-HDL-C at the end of 8 weeks of western diet in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. (F) Plasma lipid profiles of cholesterol determined by FPLC in pooled plasma of *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> mice and *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice at the end of diet. (G) Plasma levels of FFA at the end of diet in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> and *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice. (H) Hepatic gene expression of lipid metabolism-related transcripts illustrating *Aco*, *Bien*, *Mcad*, *Lcad*, *Vlcad*, *Cd36*, *Fabp1*, *Fatp1*, *Vldlr* and *Mttp*. (I) Hepatic gene expression of inflammation-associated genes illustrating *Nlrp3*, *Caspase-1*, *Il-1 $\beta$* , *Tnf- $\alpha$* , *Saa*, *Ccl3*, *Cxcl2*, *Cx3cl1*, *Mcp-1* and *Cd68*. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. Mice were submitted to a western diet supplemented (+) or not (-) by pemafibrate during 8 weeks. WD=western diet; WD+P= western diet +

pemafibrate. \*pemafibrate effect; §genotype effect. \*or§p<0.05; \*\*or§§p<0.01; \*\*\*or§§§p<0.001, \*\*\*\*or§§§§p<0.0001.

**FIGURE 3: Pemafibrate improves inflammation and lipid metabolism through hepato-specific activation of PPAR $\alpha$ .** (A) Gene expression in the liver associated to lipid metabolism derived from complementary qPCR experiments illustrating *Aco*, *Bien*, *Mcad*, *Lcad*, *Vlcad*, *Cd36*, *Fabp1*, *Fatp1*, *Vldlr* and *Mttp*. (B) Gene expression in the liver associated to inflammation derived from complementary qPCR experiments illustrating *Nlrp3*, *Caspase-1*, *Il-1 $\beta$* , *Tnf- $\alpha$* , *Saa*, *Ccl3*, *Cxcl2*, *Cx3cl1*, *Mcp-1* and *Cd68*. (C) Representative histological sections of liver stained with H&E. Magnification x200. Scale bar 20  $\mu$ m. (D) Steatosis score estimated on histological sections. Steatosis <5%, 0; 5%–33%, 1; 33%–66%, 2; >66%, 3. (E) Inflammatory score estimated on histological sections. No foci, 0;  $\leq$ 2foci, 1; >2 foci, 2. (F) Representative histological sections of livers stained for CD68. Magnification x200. Scale bar 20  $\mu$ m. (G) Quantification in the liver of the percentage CD68-positive area per field. Results are presented as the mean  $\pm$  SEM. Mice were submitted to a western diet supplemented (+) or not (-) by pemafibrate during 8 weeks. WD=western diet; WD+P= western diet + pemafibrate. \*pemafibrate effect; §genotype effect. \*or§ p<0.05; \*\*or§§ p<0.01; \*\*\*or§§§p<0.001; \*\*\*\*or§§§§p<0.0001.

**FIGURE 4: Pemafibrate improves the atherogenic dyslipidemia through activation of hepatocyte PPAR $\alpha$  transactivation activity.** Plasma levels of (A) TG, (B) TC, (C) HDL-C and (D) non-HDL-C at the end of the diet in AAV8-TBG-reconstituted *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice. (E) Plasma lipid profiles of TG determined by FPLC in pooled plasma of AAV8-TBG-reconstituted *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice. (F) Plasma lipid profiles of cholesterol determined by FPLC in pooled plasma of AAV8-GFP, AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> and AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>-reconstituted mice. (G) Plasma

levels of FFA at the end of diet in AAV8-TBG-reconstituted *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice. Results are mean ± SEM. Mice were submitted to a western diet supplemented (+) or not (-) by pemafibrate during 8 weeks. WD=western diet; WD+P= western diet + pemafibrate. \*pemafibrate effect; §genotype effect. \*or<sup>§</sup>p<0.05; \*\*or<sup>§§</sup>p<0.01; \*\*\*or<sup>§§§</sup>p<0.001.

**FIGURE 5: Pemafibrate reduces atherosclerosis development through hepatocyte PPAR $\alpha$  transrepressive activity.** (A) Representative histological sections of aortic sinus stained with oil red O and counterstained with hematoxylin, at the end of 8 weeks in AAV8 injected *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice. Magnification x40. Scale bar 100  $\mu$ m. (B) Oil red O-stained surface of atherosclerotic lesion in  $\mu$ m<sup>2</sup> from the beginning of aortic valve to ventricle. (C) Quantification of atherosclerotic lesion area through the aortic sinus. Each point represents the mean lesion area determined at a specific distance from the aortic sinus. Results are the mean ± SEM. Mice were submitted to a western diet supplemented (+) or not (-) by pemafibrate during 8 weeks. WD=western diet; WD + P= western diet + pemafibrate. \*pemafibrate effect. WD=western diet; WD+P= western diet + pemafibrate. §genotype effect; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \$\$\$p<0.001; \$\$\$\$p<0.0001.

**FIGURE 6: Pemafibrate reduces hepatic myeloid cells through hepatocyte PPAR $\alpha$  transrepressive activity.** (A) UMAP visualization and clustering of total nuclei from the snRNA-seq dataset (liver of the 6 groups of AAV8-TBG-reconstituted *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice): annotation of the 7 major clusters with their respective cell type based on the differential expression of specific marker genes. (B) Expression of representative selected marker genes for each cell type. (C) UMAP visualization of the clusters split by experimental condition: AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>, AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>-pemafibrate, AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>, AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>-pemafibrate, AAV8-GFP, AAV8-GFP-pemafibrate. The number of total nuclei was

downsampled to 10 000 per condition. **(D)** Percentage of myeloid cells in the 6 conditions AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>, AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>-pemafibrate, AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>, AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>-pemafibrate, AAV8-GFP, AAV8-GFP-pemafibrate. Results are presented as the mean  $\pm$  SEM. Mice were submitted to a western diet supplemented (+) or not (-) by pemafibrate during 8 weeks. HSCs = Hepatic stellate cells. \*pemafibrate effect; §genotype effect. §p<0.05; \*\*or§§ p<0.01.

**FIGURE 7: Pemafibrate lowers pro-inflammatory hepatocytes through hepatocyte PPAR $\alpha$  transrepressive activity.** **(A)** UMAP visualization and clustering of hepatocytes from the snRNA-seq dataset performed with Seurat with a resolution of 0.5 **(B)** UMAP visualization of the hepatocyte clusters split by experimental condition: AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>, AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>-pemafibrate, AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>, AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>-pemafibrate, AAV8-GFP, AAV8-GFP-pemafibrate. The number of total nuclei was downsampled to 4 000 per condition. **(C)** Heatmap showing scaled expression of the top 50 genes in each hepatocyte cluster. Five cell type-specific canonical markers found within the top 50 genes per cluster are displayed. **(D)** GOBP signaling pathway enrichment of the upregulated genes in cluster hepato 6. Top 10 pathways with lower adjusted p value are displayed. **(E)** Expression of genes enriched in hepato 6 in the UMAP space in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>, and pemafibrate treated-AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> mice. **(F)** GOBP signaling pathway enrichment of the upregulated genes in cluster hepato 5. Top 10 pathways with lower adjusted p value are displayed. **(G)** Expression of genes enriched in hepato 5 in the UMAP space in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>, and pemafibrate treated-AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice. **(H)** UMAP visualization and clustering of myeloid cells and neutrophils from the snRNA-seq dataset performed with Seurat with a resolution of 0.8. **(I)** UMAP visualization of the myeloid cell and neutrophil clusters in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> and AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>-pemafibrate mice. The number of nuclei was downsampled to 2 000 per condition **(J)** Heatmap showing scaled expression of

the top 50 genes in each myeloid cell and neutrophil cluster. Five cell type-specific canonical markers found within the top 50 genes per cluster are displayed. **(K)** Expression of genes enriched in myeloid clusters 1 and 3 and neutrophils in the UMAP space in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>, and pemafibrate treated-AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mice. Mice were submitted to a western diet supplemented (+) or not (-) by pemafibrate during 8 weeks. Hepato = Hepatocytes; Myeloid = Myeloid cells; Neutro = neutrophils; NES = Normalized enrichment score.

**FIGURE 8: Pemafibrate decreases plasma IL-1 $\beta$  levels and intraplaque macrophage content through PPAR $\alpha$  transrepressive activity.** **(A)** Representative histological sections of the aortic sinus stained with MOMA-2. Magnification x40. Scale bar 100  $\mu$ m. **(B)** Quantification at the maximum plaque area of MOMA-2 positive cells. **(C)** Representative histological sections of the aortic sinus stained with VCAM-1. Magnification x40. Scale bar 100  $\mu$ m. **(D)** Quantification at the maximum plaque area of VCAM-1 positive cells. **(E)** Plasma levels of IL-1 $\beta$  at the end of the diet in AAV8-TBG-reconstituted *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice. **(F)** Schematic representation of the effect of the hepato-specific activation of PPAR $\alpha$  transrepressive activity by pemafibrate on atherosclerosis development. Activation of hepatocyte PPAR $\alpha$  transrepressive activity by pemafibrate decreases hepatic leukocyte recruitment and activation thus limiting the production and secretion of IL-1 $\beta$  in blood ultimately decreasing atherosclerotic plaque macrophage content and burden. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. Mice were submitted to a western diet supplemented (+) or not (-) by pemafibrate during 8 weeks. WD=western diet; WD+P= western diet + pemafibrate. \*pemafibrate effect; <sup>s</sup>genotype effect. \*or<sup>s</sup>p<0.05; \*\*or<sup>ss</sup>p<0.01; <sup>sss</sup>p<0.001.

**SUPPLEMENTARY FIGURE 1: Pemafibrate improves hepatic lipid metabolism and inflammation in a PPAR $\alpha$ -dependent manner in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.** **(A)** Representative histological

sections of liver stained with H&E. Magnification x200. Scale bar 20  $\mu$ m. **(B)** Steatosis score estimated on histological sections. Steatosis <5%, 0; 5%– 33%, 1; 33%–66%, 2; >66%, 3. **(C)** Inflammatory score estimated on histological sections. No foci, 0;  $\leq$ 2foci, 1; >2 foci, 2. **(D)** Representative histological sections of livers stained for CD68. Magnification x200. Scale bar 20  $\mu$ m. **(E)** Quantification in the liver of the percentage CD68-positive area per field. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. Mice were submitted to a western diet supplemented (+) or not (-) by pemafibrate during 8 weeks. WD=western diet; WD+P= western diet + pemafibrate. \*pemafibrate effect; <sup>s</sup>genotype effect. <sup>s</sup>p<0.05; <sup>ss</sup> p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*or<sup>ssss</sup>p<0.0001.

**SUPPLEMENTARY FIGURE 2: Experimental protocol to evaluate the mechanism of action involved in the atheroprotective effects of PPAR $\alpha$  in *Ldlr*<sup>-/-</sup>.** **(A)** *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> and *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>, as well as *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice injected either with AAV8-TBG-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> (in order to restore PPAR $\alpha$  selectively in the hepatocytes), or with AAV8-TBG-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> (a mutant of PPAR $\alpha$  only exerting its anti-inflammatory properties), or with AAV8-TBG-GFP (used as a control), were challenged with a western diet containing 0.2% cholesterol supplemented or not with pemafibrate at a dose of 0.018g/kg of diet (equivalent to 0.3 mpk) during 8 weeks (n=8-12 mice/group). At the end of the diet, heart, liver and plasma were collected for histological, biochemical and molecular analysis. **(B)** Position (shown by an orange circle) and sequence of the R150Q mutation introduced in the mouse PPAR $\alpha$  sequence in the two zinc fingers of the DNA binding domain (DBD) to obtain PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> mutant. This single amino acid mutation was introduced in mouse PPAR $\alpha$  coding DNA sequence by site directed mutagenesis using the QuickChange II kit (Stratagene, USA).

**SUPPLEMENTARY FIGURE 3: Hepatic PPAR $\alpha$  expression in AAV8-TBG restored *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice.** **(A)** Gene expression of *Ppara* in the liver of *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> injected either

with an AAV8-TBG-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> or with an AAV8-TBG-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> compared to *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> wild-type mice. **(B)** PPAR $\alpha$  protein analysis and quantification in liver homogenate of *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> injected either with an AAV8-TBG-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> or with an AAV8-TBG-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> compared to *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> wild-type mice (n=3 pools/condition). Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. Mice were submitted to a western diet supplemented (+) or not (-) by pemaifibrate during 8 weeks. ns= non-significant.

**SUPPLEMENTARY FIGURE 4: Hepatic PPAR $\alpha$  expression is restricted to hepatocytes in AAV8-TBG restored *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup> mice.** **(A)** UMAP plot representing the clustering of the high-quality nuclei in the snRNA-seq dataset at a resolution of 0.5. **(B)** UMAP plot showing the expression of marker genes used for the identification of each cluster. **(C)** Heatmap showing average expression of the top 50 genes in each cluster. Five cell type-specific canonical markers found within the top 50 genes per cluster are displayed. **(D)** UMAP plot showing the expression of PPAR $\alpha$  in AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>, AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup>-pemaifibrate, AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> and AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup>-pemaifibrate, mice. **(E)** Coverage plot of snRNAseq data showing disruption of the *Ppara* gene in exon 8 of the ligand-binding domain replaced by the Neo cassette in AAV8-GFP and AVV8-GFP-pemaifibrate mice and detection of a full-length transcript in the AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>WT</sup> and AAV8-PPAR $\alpha$ <sup>DISS</sup> with and without pemaifibrate. Mice were submitted to a western diet supplemented (+) or not (-) by pemaifibrate during 8 weeks. HSCs=Hepatic stellate cells.

**SUPPLEMENTARY FIGURE 5: Pemaifibrate reduces intra-plaque SMC number through PPAR $\alpha$  transrepressive activity.** **(A)** Representative histological sections of the aortic sinus stained with  $\alpha$ -SMA. Magnification x40. Scale bar 100  $\mu$ m. **(B)** Quantification at the maximum plaque area of  $\alpha$ -SMA positive cells. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM.

Mice were submitted to a western diet supplemented (+) or not (-) by pemaifibrate during 8 weeks. WD=western diet; WD+P= western diet + pemaifibrate. \*pemaifibrate effect; §genotype effect. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \$\$\$p<0.001.

**SUPPLEMENTARY TABLE 1: Pemaifibrate does not modify the circulating profile of immune cells in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.** Blood levels of total WBC, neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils measured at the end of diet in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>+/+</sup> and *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Ppara*<sup>-/-</sup>. Results are mean ± SEM. Mice were submitted to a western diet supplemented or not by pemaifibrate during 8 weeks. WBC = White blood cells.

**SUPPLEMENTARY DATA 1: List of the top 50 markers for each cluster compared to other nuclei in total liver nuclei**

**SUPPLEMENTARY DATA 2: List of the top 50 markers for each cluster compared to other nuclei in hepatocytes**

**SUPPLEMENTARY DATA 3: List of the top 50 markers for each cluster compared to other nuclei in myeloid cells and neutrophils**

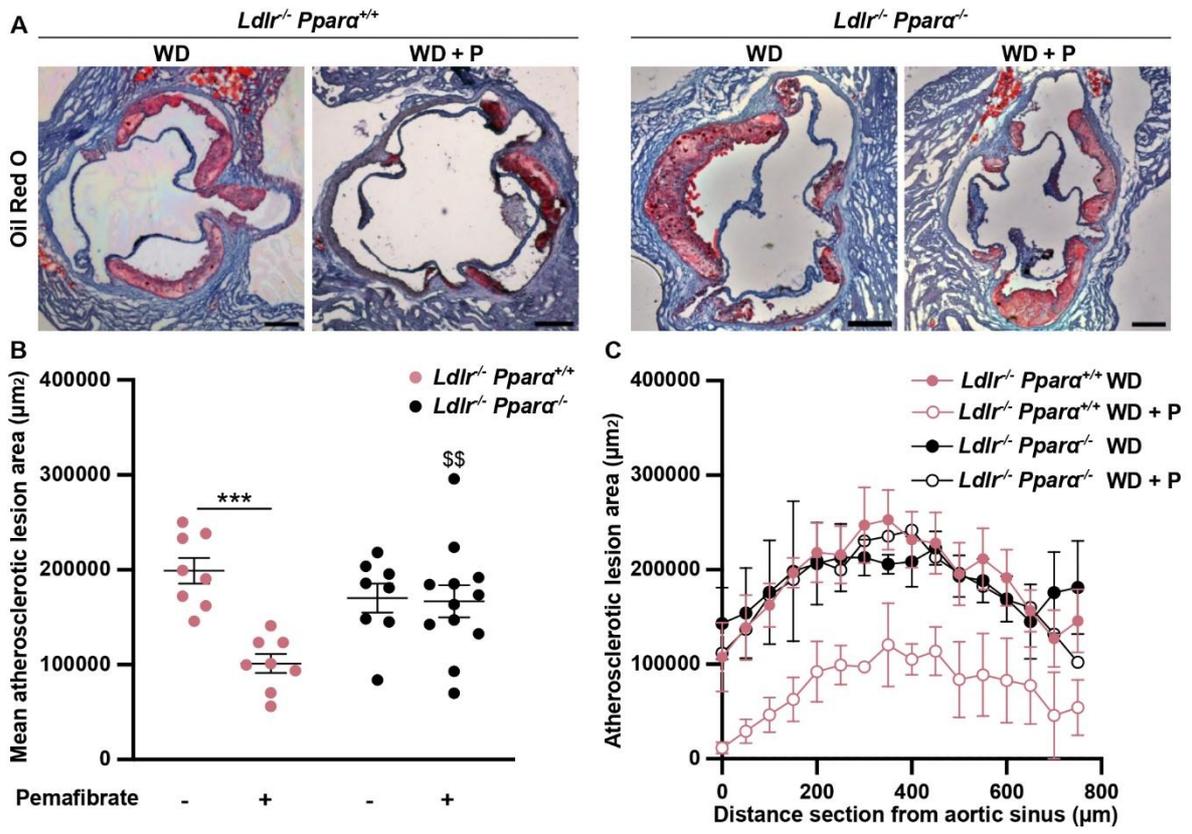


Figure 1

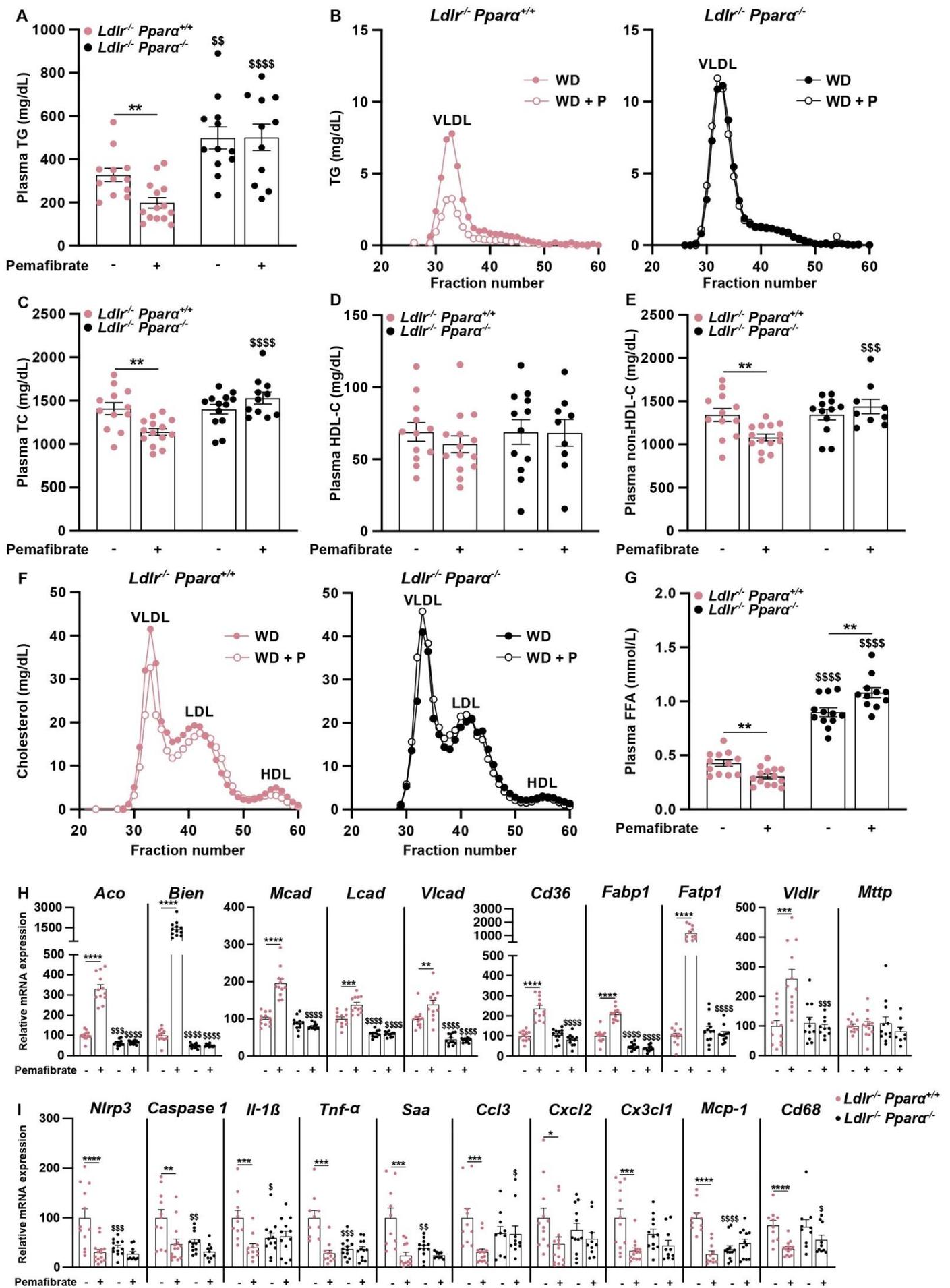


Figure 2

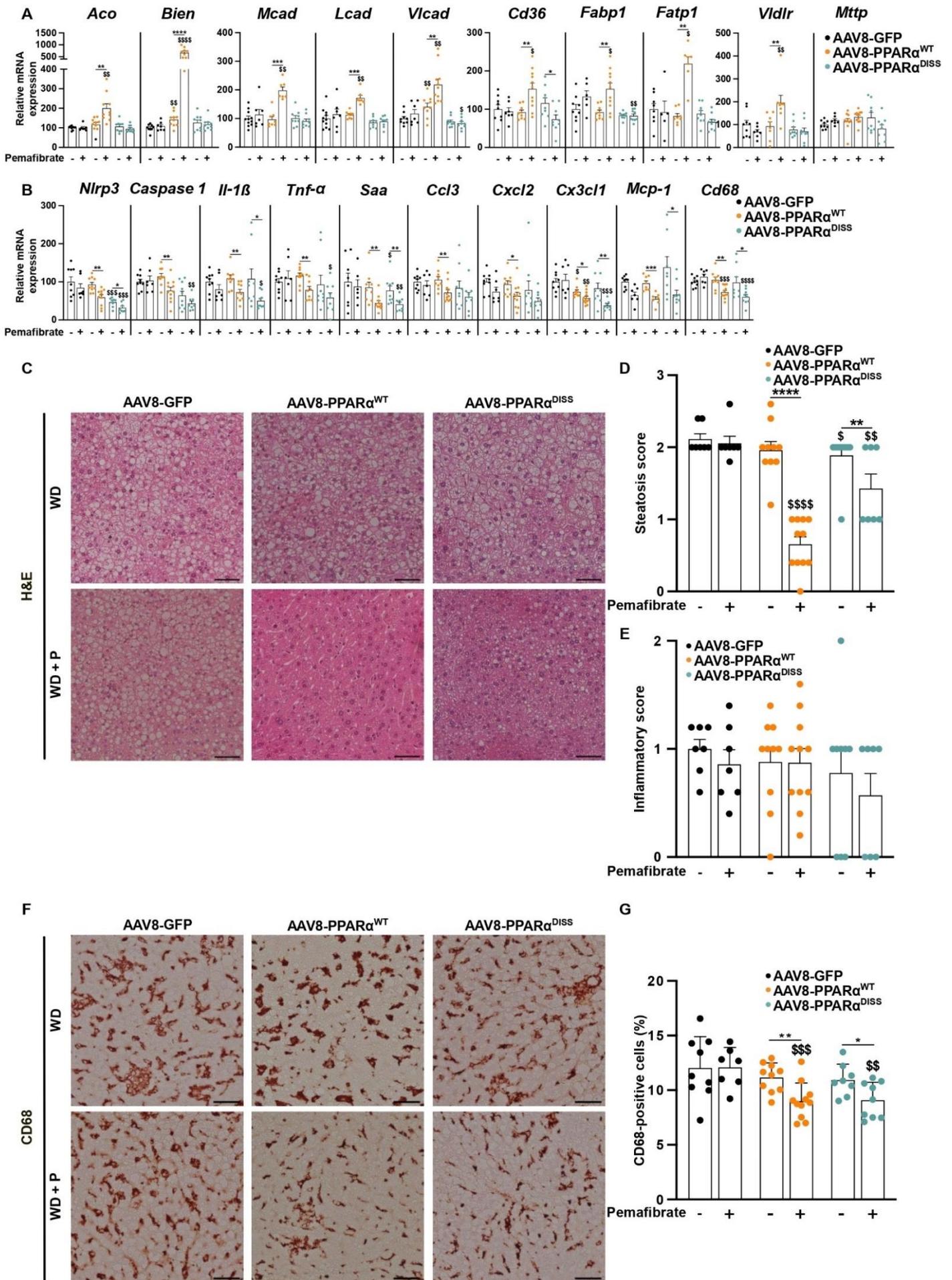


Figure 3

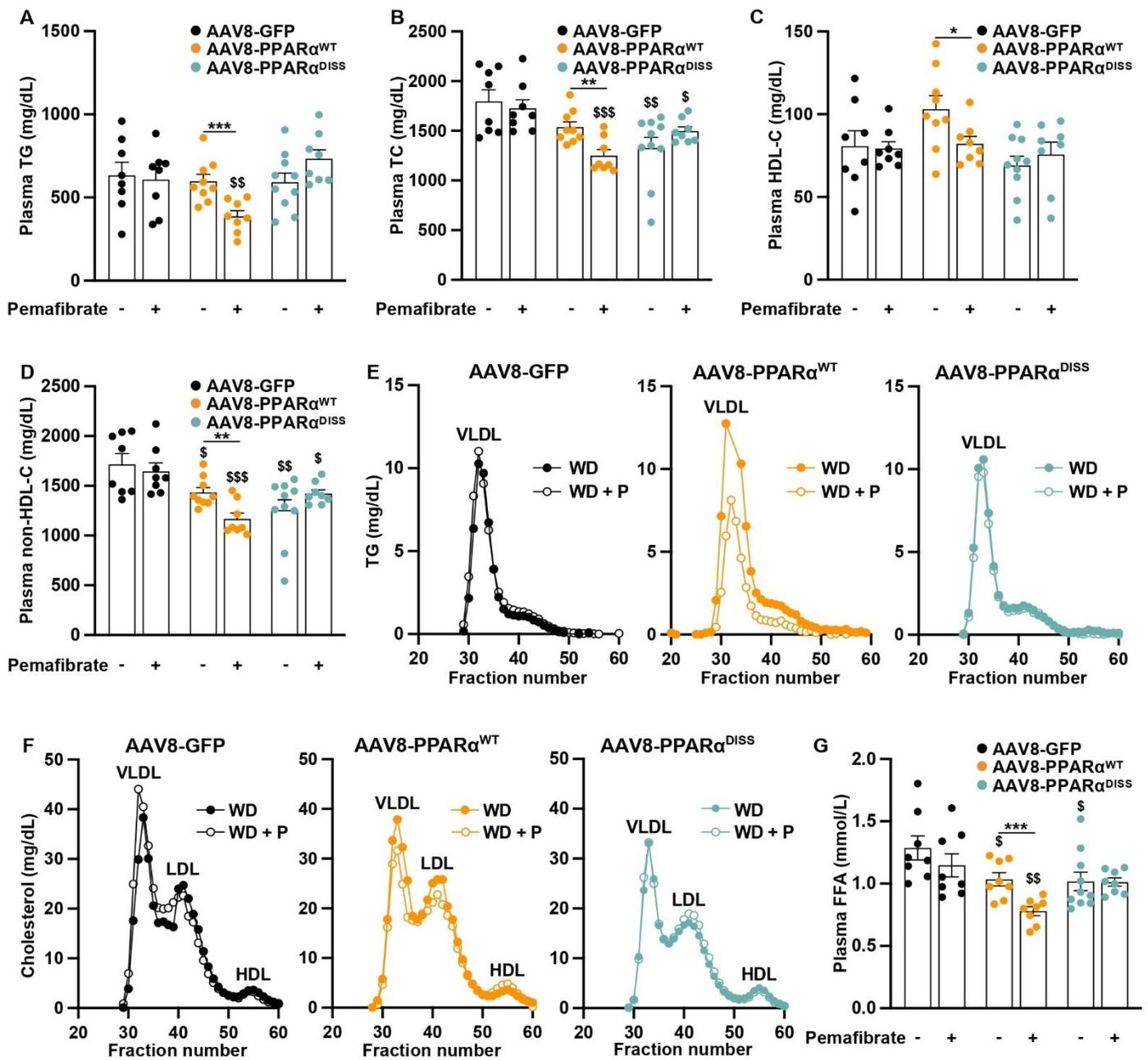


Figure 4

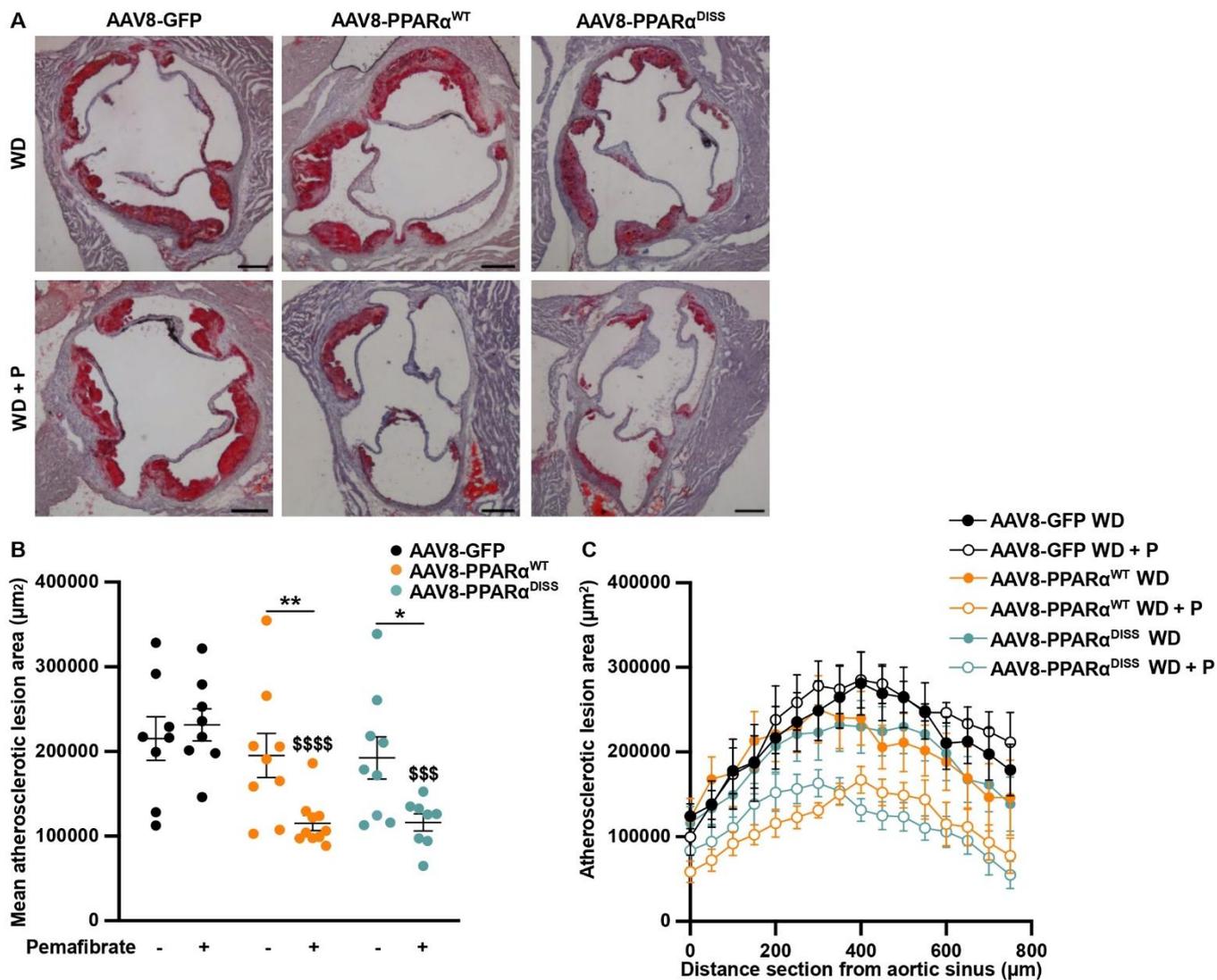
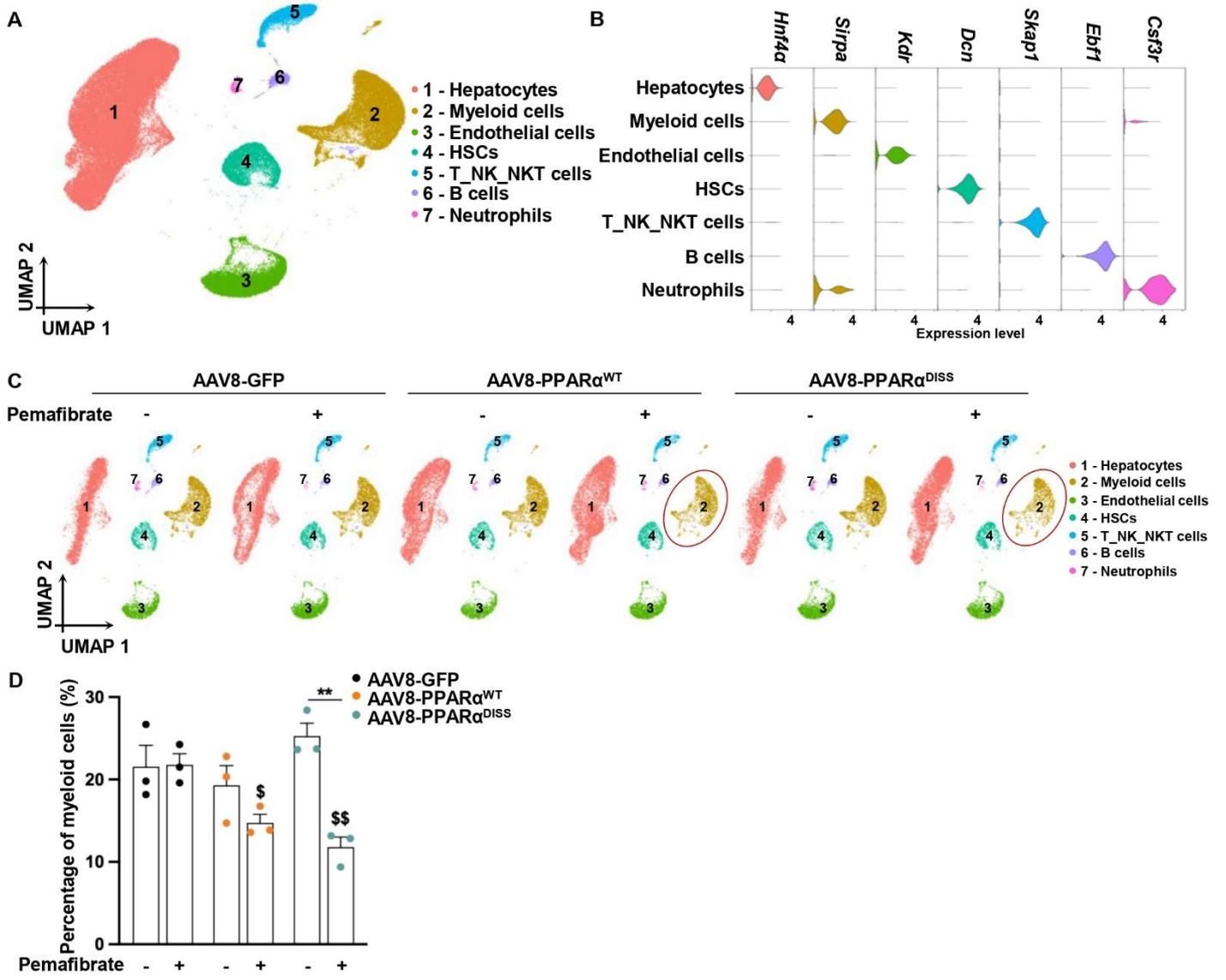


Figure 5



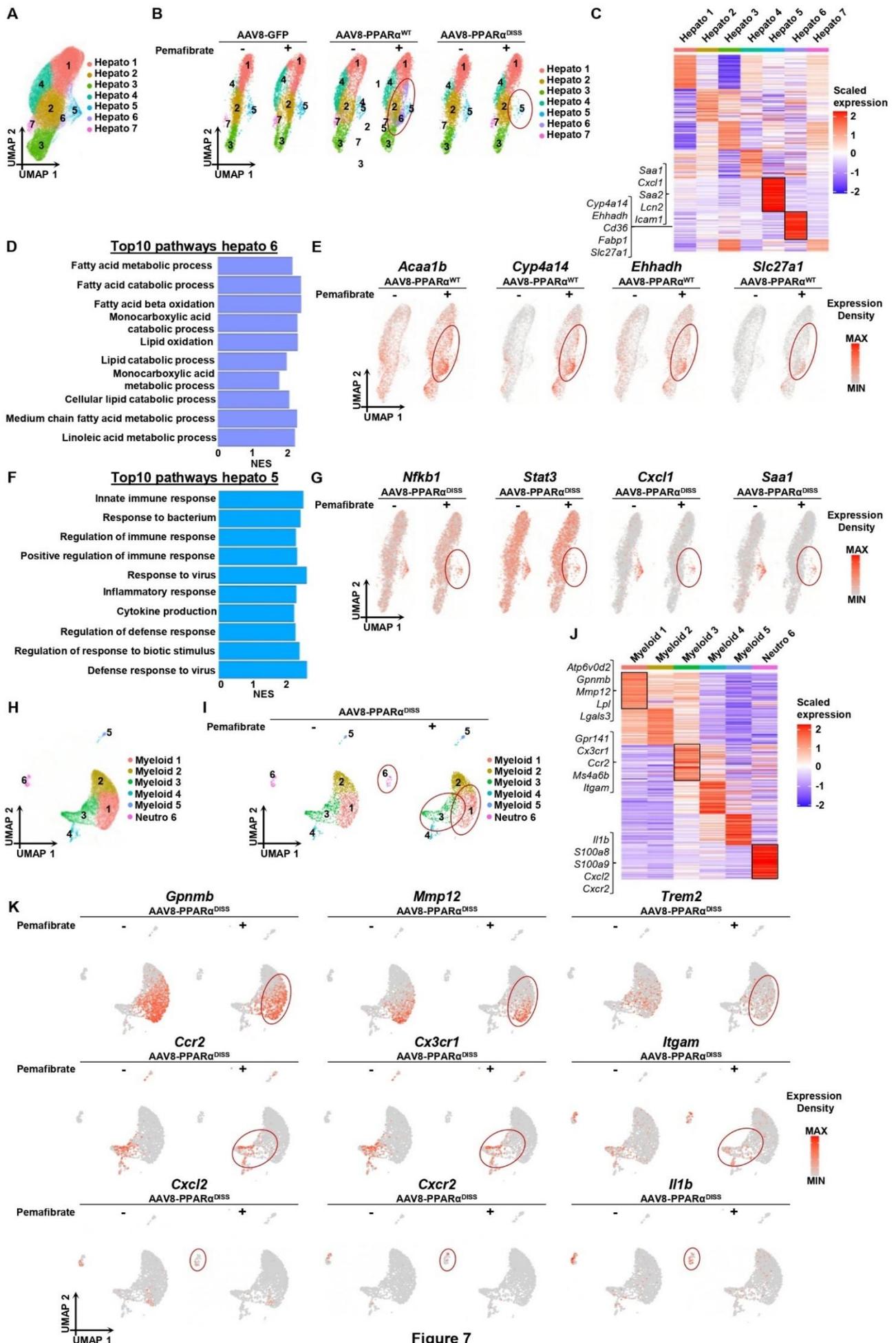


Figure 7

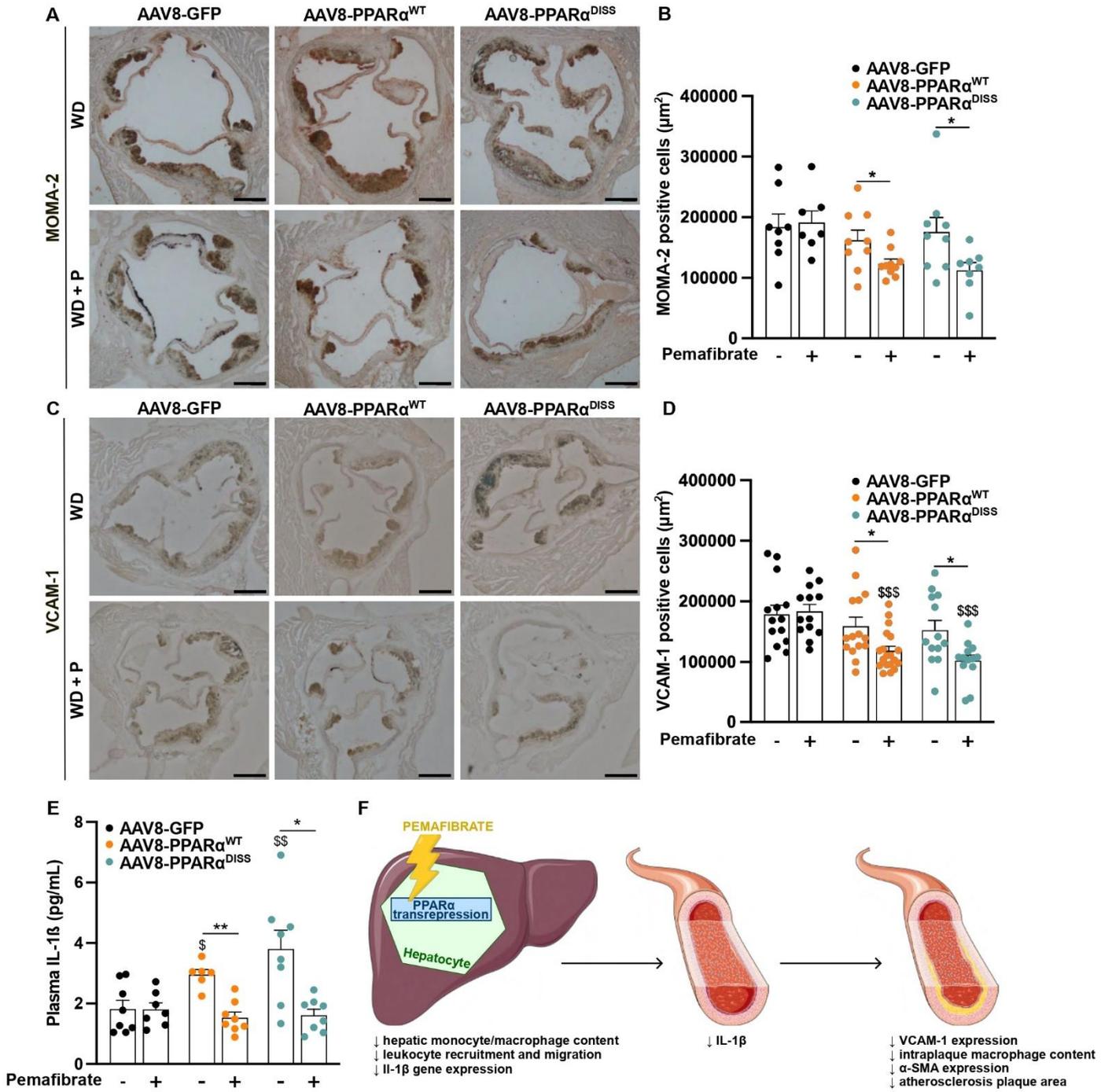
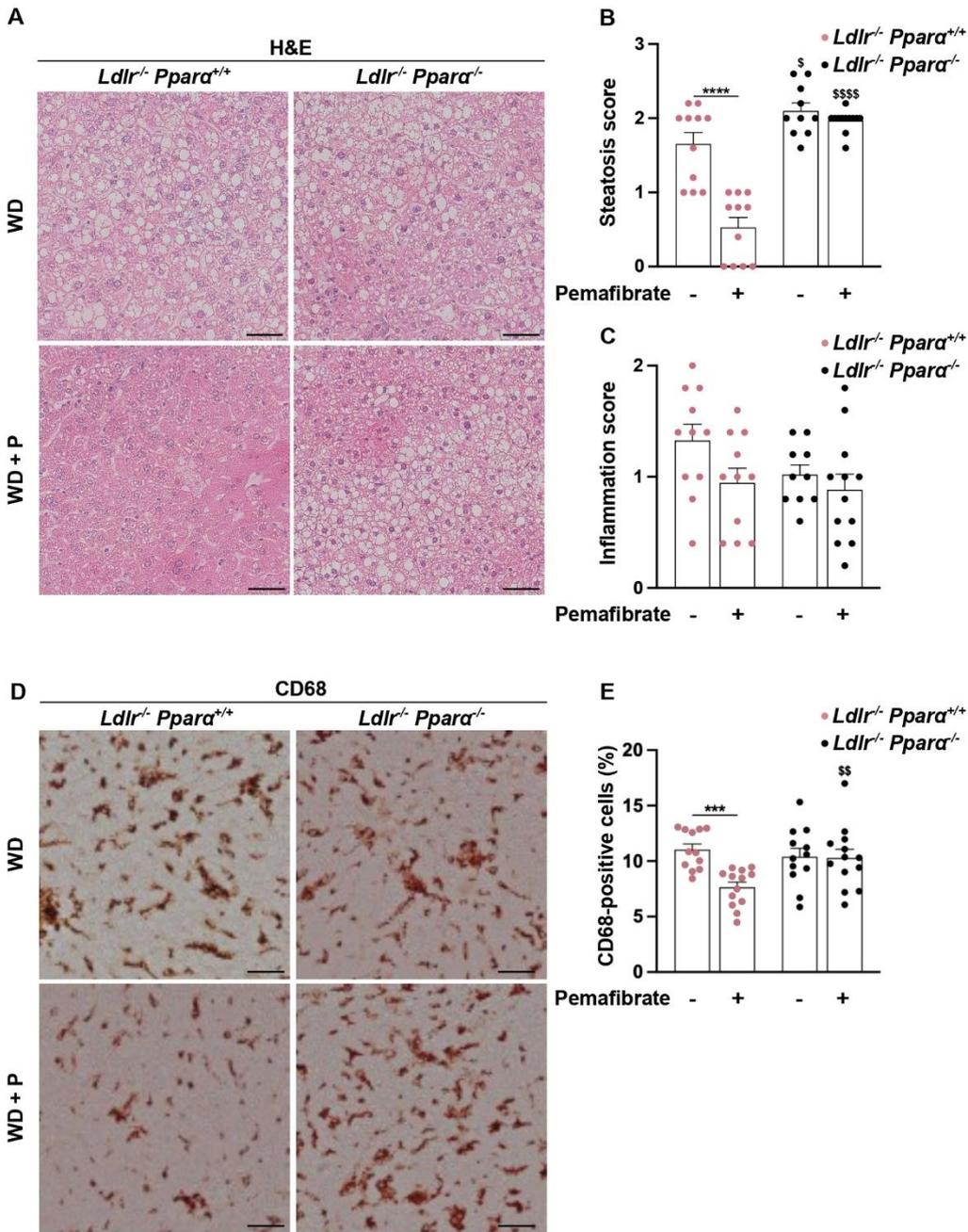
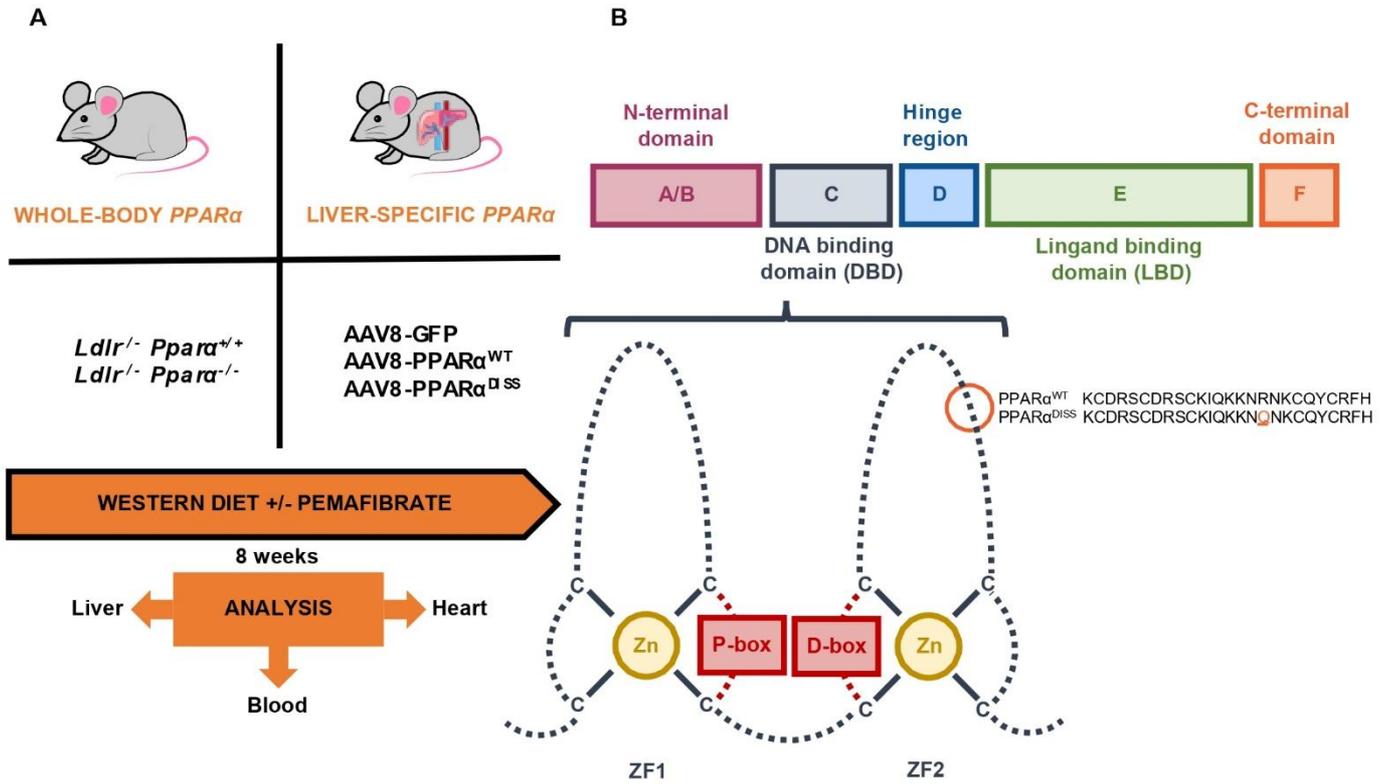


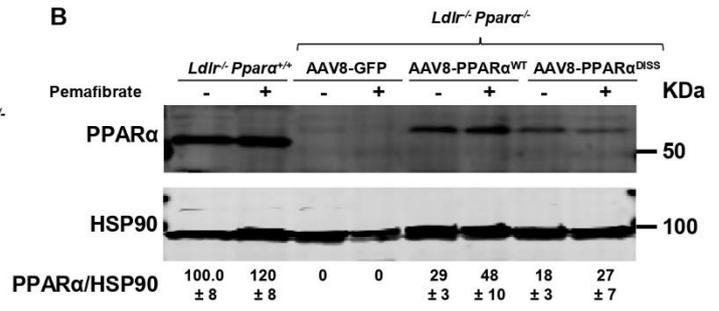
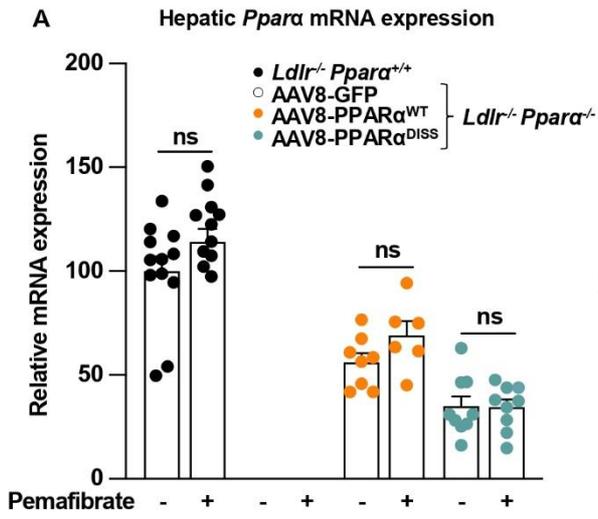
Figure 8



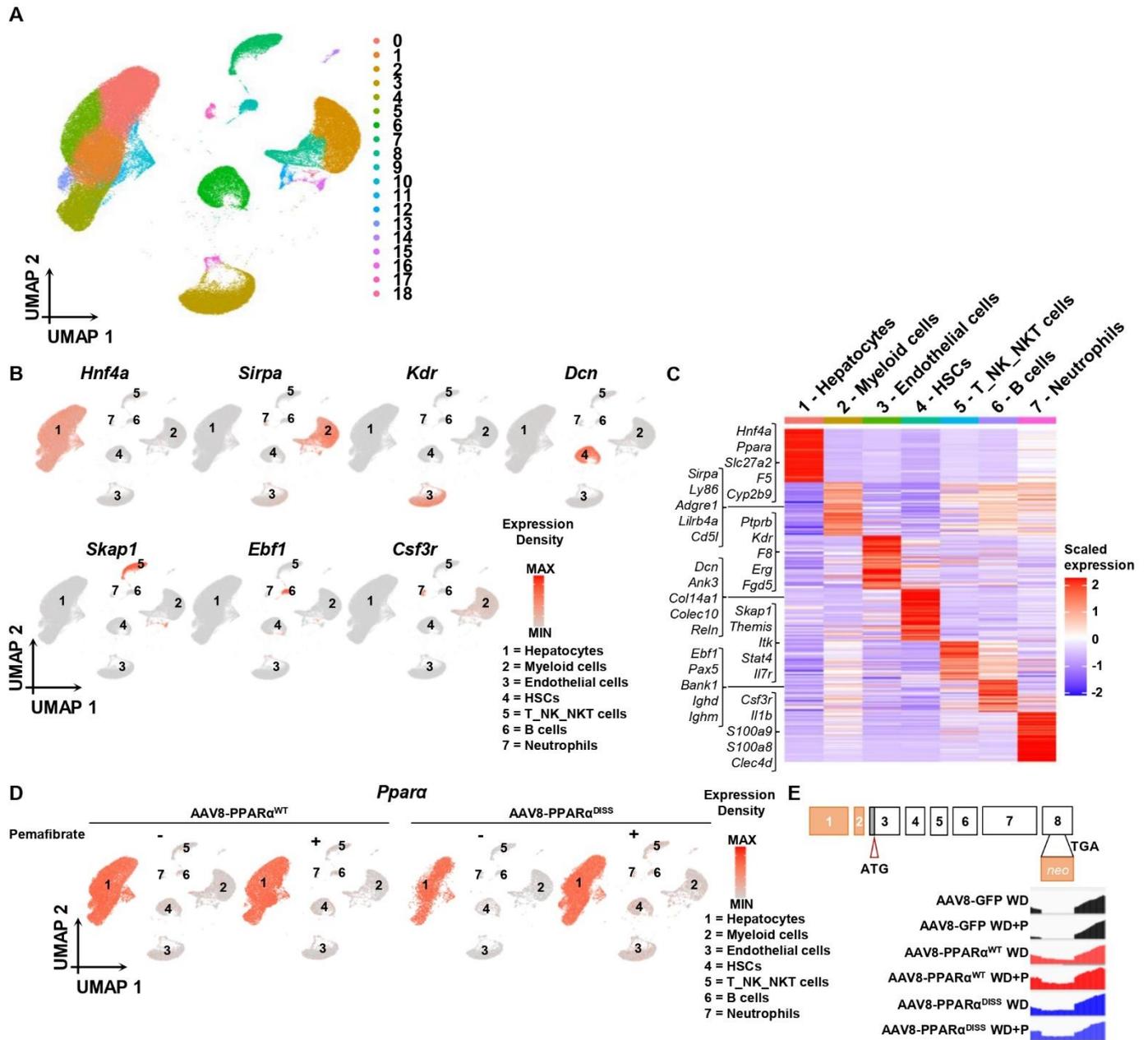
Supplementary figure 1



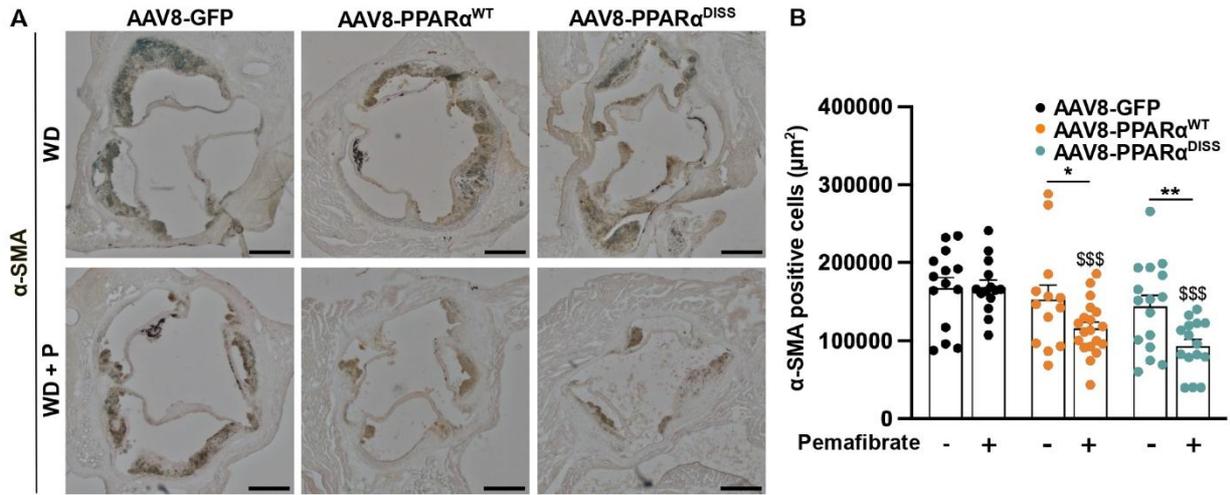
Supplementary figure 2



Supplementary figure 3



Supplementary figure 4



Supplementary figure 5

Pemaifibrate	<i>Ldlr<sup>-/-</sup> Ppara<sup>+/+</sup></i>		<i>Ldlr<sup>-/-</sup> Ppara<sup>-/-</sup></i>		ANOVA		
	-	+	-	+	Genotype effect	Pemaifibrate effect	Genotype x pemaifibrate effect
Total WBC (x10 <sup>6</sup> /μL)	7.18 ± 0.60	8.30 ± 0.57	7.73 ± 0.49	7.10 ± 0.40	0.54	0.64	0.10
Neutrophils (x10 <sup>6</sup> /μL)	1.22 ± 0.12	1.10 ± 0.18	1.20 ± 0.11	1.18 ± 0.15	0.81	0.64	0.75
Lymphocytes (x10 <sup>6</sup> /μL)	5.21 ± 0.51	6.32 ± 0.45	5.78 ± 0.45	5.31 ± 0.34	0.62	0.48	0.08
Monocytes (x10 <sup>6</sup> /μL)	0.53 ± 0.04	0.61 ± 0.10	0.53 ± 0.05	0.42 ± 0.03	0.13	0.76	0.12
Eosinophils (x10 <sup>6</sup> /μL)	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.48	0.91	0.56
Basophils (x10 <sup>6</sup> /μL)	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.09	0.48	0.38

Supplementary table 1





**ANNEXE 2**



Demande de brevet internationale : « A NEW RELEVANT NON-HUMAN ANIMAL MODEL OF PROGRESSIVE METABOLIC DYSFUNCTION ASSOCIATED STEATOTIC LIVER DISEASE (MASLD) AND ATHEROSCLEROSIS DEVELOPMENT » (BIO22024 LALLOYER) déposée le mercredi 19 juin 2024.

Numéro de dépôt : PCT/EP2024/067169

Déposants : Centre Hospitalier Universitaire de Lille/INSERM/Institut Pasteur de Lille/Université de Lille

Inventeurs : Mme Fanny LALLOYER/M. Eric BAUGE/M. Bart STAELS/Mme Doriane HENRY

## Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for the processing of an international application according to the Patent Cooperation Treaty as follows:

Submission number	13311423	
PCT application number	PCT/EP2024/067169	
Date of receipt	19 June 2024	
Receiving Office	European Patent Office, The Hague	
Your reference	LALLOYER22024MC-AA	
Applicant	INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE	
Number of applicants	4	
Country	FR	
Title	A NEW RELEVANT NON-HUMAN ANIMAL MODEL OF PROGRESSIVE METABOLIC DYSFUNCTION-ASSOCIATED STEATOTIC LIVER DISEASE (MASLD) AND ATHEROSCLEROSIS DEVELOPMENT	
Documents submitted	<p>LALLOYER22024MCAA-pkda.xml</p> <p>LALLOYER22024MCAA-appb.xml</p> <p>LALLOYER22024MCAA-fees.xml</p> <p>LALLOYER22024MCAA-appb-000004.pdf (17 p.)</p> <p>Pct101.PDF (6 p.)</p> <p>abstract.txt</p>	<p>LALLOYER22024MCAA-requ.xml</p> <p>LALLOYER22024MCAA-seqI-000001.zip</p> <p>LALLOYER22024MCAA-appb-000005.pdf (12 p.)</p> <p>LALLOYER22024MCAA-vlog.xml</p> <p>LALLOYER22024MCAA-pkgh.xml</p>

Submitted by	CN=secure.epoline.org
Method of submission	Online
Date and time receipt generated	19 June 2024, 16:42 (CEST)
Message Digest	60:33:2A:F6:86:49:7C:3C:D3:7C:0B:24:A9:B5:6F:B2:41:FD:79:5D

/European Patent Office/

**DAS access code**

The access code generated for this application and used to retrieve the priority documents from WIPO's Digital Access Service (DAS) is indicated in the document appended to this acknowledgement of receipt. Please note that the appended document is non-public and will not be published.

/European Patent Office/





**ANNEXE 3**



## **Historical overview of the evolution of lipid-lowering drugs used in the management of cardiovascular risk**

Doriane Henry <sup>1</sup>, Eric Baugé <sup>1</sup>, Bart Staels<sup>1</sup>, Fanny Lalloyer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ. Lille, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011-EGID, F-59000, Lille, France

### **Abstract**

Before the Framingham Heart Study, little was known about cardiovascular risk. The first two reports in 1957 and 1961 identified high cholesterol levels as a major risk factor for cardiovascular diseases (CVD), highlighting the importance of lipid management to reduce CVD risk. Since then, the growing knowledge of CVD pathophysiology led to the development of many drugs to manage dyslipidemia and consequently cardiovascular risk. Unfortunately, many of them, such as HDL-targeted or TG-modulating drugs, so far failed in clinical trials due to a lack of efficacy on cardiovascular protection or due to the appearance of side effects. Interestingly, LDL-targeted statin therapy revolutionized cardiovascular risk management and remains today the reference treatment in primary and secondary CVD prevention. In the last decades, novel LDL-targeted drugs, such as ezetimibe, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) targeted therapies and bempedoic acid, have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) and have now found their place among the therapeutic arsenal of hypolipemic drugs used in CVD risk management, in case of intolerance to statins or rather often associated to statins. This review focuses on the historical evolution of developed strategies and on the successes and failures of lipid-lowering drugs tested to reduce cardiovascular risk, from mid-20th century to present, and concludes with novel challenging strategies in progress.

Keywords: drug, cardiovascular disease, lipid, history

### **Introduction**

According to the World Health Organization (WHO), cardiovascular diseases (CVD) are currently the leading cause of death in the world, with around 17.9 million deaths annually<sup>1</sup>. Until the end of World War II, knowledge about CVD was poor, and CVD was seen as an obvious consequence of advancing age. However, in 1945, the early death of the American president Franklin D. Roosevelt from stroke due to uncontrolled hypertension stimulated research about CVD in the United States (US). The objectives were to identify the causative factors that could contribute to heart disease and stroke, since, at that time, CVD and stroke were responsible for one in two deaths in the US. In 1948, the direction of the National Heart Institute, now known as the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI), launched the Framingham Heart study (FHS), the first long-term epidemiological study still ongoing today (3<sup>rd</sup> generation). The FHS is at the origin of the concept of “risk factors”, and much of what is known about CVD is attributable to this study. Among these risk factors, the FHS investigators identified elevated cholesterol levels as a major risk factor for CVD, highlighting the importance of lipid management to prevent cardiovascular risk<sup>2,3</sup>. Since this discovery, several strategies were tested and adopted to control lipid levels, implicating modifications of lifestyle intervention and physical activity, surgical operations and drug therapies. This review focuses on the evolution of drugs used for the management of dyslipidemia to reduce cardiovascular risk, from the mid-20th century to the present, to finish with a discussion of new challenging hypolipidemic therapies with promise for future cardiovascular management.

**The FHS and the establishment of the concept of cardiovascular “risk factors”, highlighting elevated blood cholesterol levels as a major one**

The recruitment of the Original Cohort of the FHS was performed between 1948 and 1952 among the population of the town of Framingham in Massachusetts. It consisted of 5,209 patients, both men and women (women accounting for over half of the participants), aged between 28 and 62 years. This cohort was particularly interesting, since, until then, epidemiological studies only had very small numbers of women or excluded them. The first two reports, published in 1957 and 1961, highlighted high cholesterol levels, but also high blood pressure, male sex, older age and left ventricular hypertrophy by electrocardiography (ECG), to be important predictors of heart disease risk<sup>2,3</sup>. In this report from 1961, Kannel and colleagues popularized the term “risk factor”<sup>3</sup>. In 1962 and 1964, two reports revealed a strong

association between smoking and coronary heart disease (CHD)<sup>4,5</sup>. Shortly after in 1967, several other classical risk factors were identified, such as physical inactivity and obesity<sup>6,7</sup>. In the meantime, the FHS laboratory started to separate plasma lipoprotein subfractions resulting in the identification of the importance of low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) concentrations and the interest of the LDL-C:HDL-C ratio<sup>8</sup>. This progress led to the identification of HDL-C as a protective factor for CHD in 1977<sup>9</sup>.

In 1971, the second generation of participants consisting of the offspring of the Original Cohort and their spouses (over 5,000 men and women) were enrolled in the Offspring Cohort in order to study young adults<sup>10</sup>. In 1974 and 1979, two reports linked diabetes to risk of heart disease<sup>11,12</sup>. Between both reports, in 1976, risk of CVD was found to be higher in women after menopause<sup>13</sup>. In 1985, the National Institute of Health (NIH) published the first guidelines concerning cholesterol levels, referencing the findings of the FHS and highlighting the strategy of reducing blood cholesterol to prevent heart disease<sup>14</sup>. The NHLBI subsequently launched the National Cholesterol Education Program, providing detailed guidelines in adults for the treatment of high blood cholesterol for CVD prevention through recommended dietary changes and drug treatment (bile acid sequestrants and nicotinic acid which were the drugs of first choice at this time) if six months of intensive dietary therapy were not sufficient to reduce LDL-C levels<sup>15</sup>. In the early 1990s, the FHS study grew to reflect the increasing diversity of the community. In this way, in 1994, 507 men and women of African-American, Hispanic, Asian, Indian, Pacific Islander and Native American origins were included in the Omni One Cohort, evaluating the possible influence of race and heritage on heart disease. The popularization of the risk factor concept had led to the development of clinical risk scores. In 1998, Wilson et al. published the best known risk profile for CHD, the Framingham Risk Score, an equation for estimation of the ten-year CVD risk which allowed clinicians to properly classify patients as low, intermediate, or high risk for future CHD<sup>16</sup>. In 2002, the Generation Three Cohort enrolling the grandchildren of the original participants (children of the Offspring Cohort) was constituted to provide greater resources of phenotypic and genotypic information<sup>17</sup>. In 2003, the Omni Two Cohort consisting of a second-generation study involving children of the Omni One Cohort participants completed the studies. In 2009, the FHS was part of the Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) consortium,

with four other epidemiological prospective cohort studies. A meta-analysis of these five cohorts allowed identifying several risk genes for CVD<sup>18</sup>.

The FHS showed that most cardiovascular risk factors are modifiable like smoking, high blood pressure, obesity, physical inactivity or high cholesterol levels, and it provided key insights into their management. The centennial edition of the Merck Manual listed the FHS as fourth among the 100 most significant advances in 20<sup>th</sup>-century medicine<sup>19</sup>. Today, the FHS still contributes to decreasing cardiovascular deaths and continues to improve our understanding and knowledge about CVD (Figure 1).

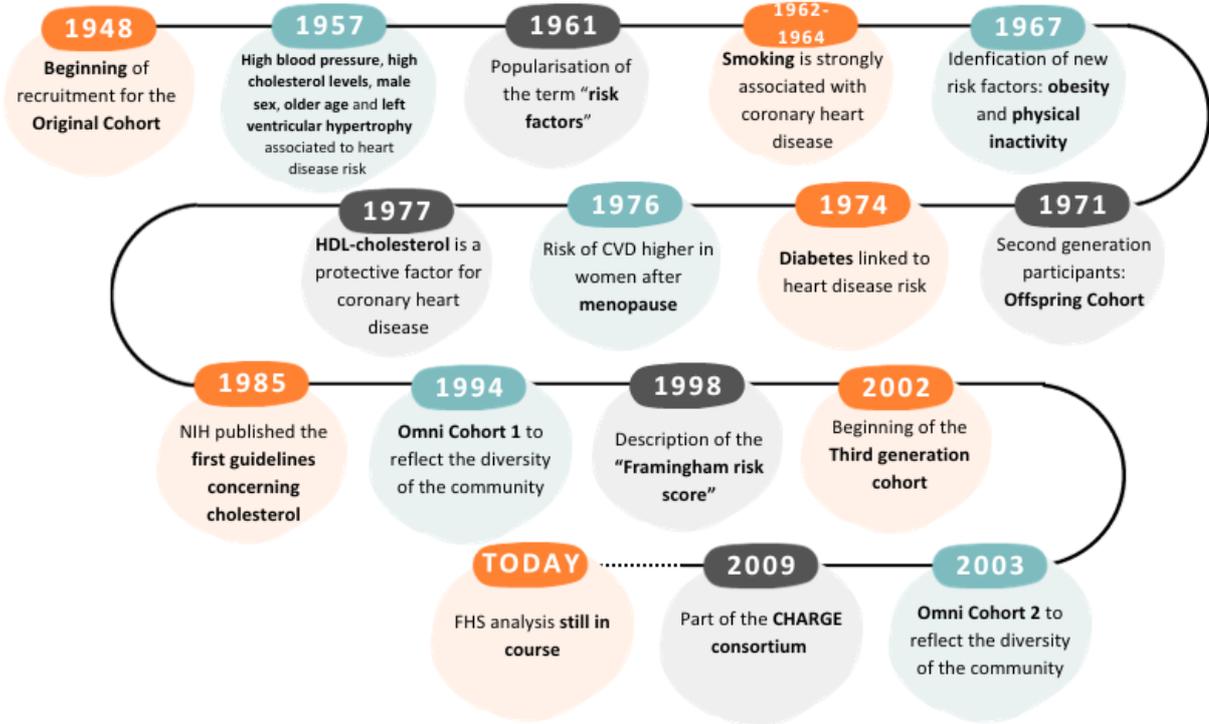


Figure 1: Milestones in the Framingham Heart Study

On the heels of the Framingham reports, numerous studies confirmed abnormal levels of cholesterol as a major risk for CVD. Evidence from clinical trials showed that decreasing total cholesterol by lowering LDL-C levels with for example cholestyramine in the Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial (LRC-CPPT)<sup>20</sup>, or statins in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS)<sup>21,22</sup> or Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S study)<sup>23</sup> decreases CVD incidence. In 2005, a meta-analysis of 14 randomized trials including data from 90,000 individuals under statin therapy versus placebo confirmed that interventions leading to lower LDL-C levels significantly reduce the incidence of CVD<sup>24</sup>. In addition, several prospective American studies, such as the Coronary Primary Prevention Trial (CPPT), the

Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) or the Lipid Research Clinics Follow-up Study (LRCF), reported a strong inverse relation between HDL-C levels and CVD risk<sup>25,26</sup>. Then, many randomized controlled studies, such as the Helsinki Heart Study (HHS)<sup>27</sup>, the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS)<sup>28</sup> or the Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT) studies<sup>29</sup>, were initiated to further investigate the role of low HDL-C as independent risk factors for CVD. Finally, causal associations between CVD mortality and total cholesterol (TC), especially LDL-C, and inverse associations between CVD mortality and HDL-C, were demonstrated<sup>30,31</sup>, even though, quite recently, it was suggested that extremely high HDL-C levels might increase CVD risk<sup>32,33</sup>. Moreover, after several decades of controversial research<sup>34</sup> and based on data of prospective studies and meta-analyses, triglycerides (TG) (fasting and non-fasting) were also shown to be an independent risk factor for CVD, independently of HDL-C, in 1996<sup>35</sup>, and in the two studies Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) and Copenhagen Male Study in 1998<sup>36,37</sup>, which was further supported later in prospective studies and meta-analyses<sup>38-41</sup>. Interestingly, as originally proposed in 1979<sup>42</sup>, renewed attention is now attributed rather to TG-rich lipoproteins and remnant cholesterol as a residual cardiovascular risk factor<sup>43</sup>. Altogether, this aroused interest to recapitulate the historical evolution of drugs used in the therapeutic management of dyslipidemia to prevent CVD risk. The different lipid-lowering drugs tested in this cardiovascular context as well as their targets are presented in figure 2.

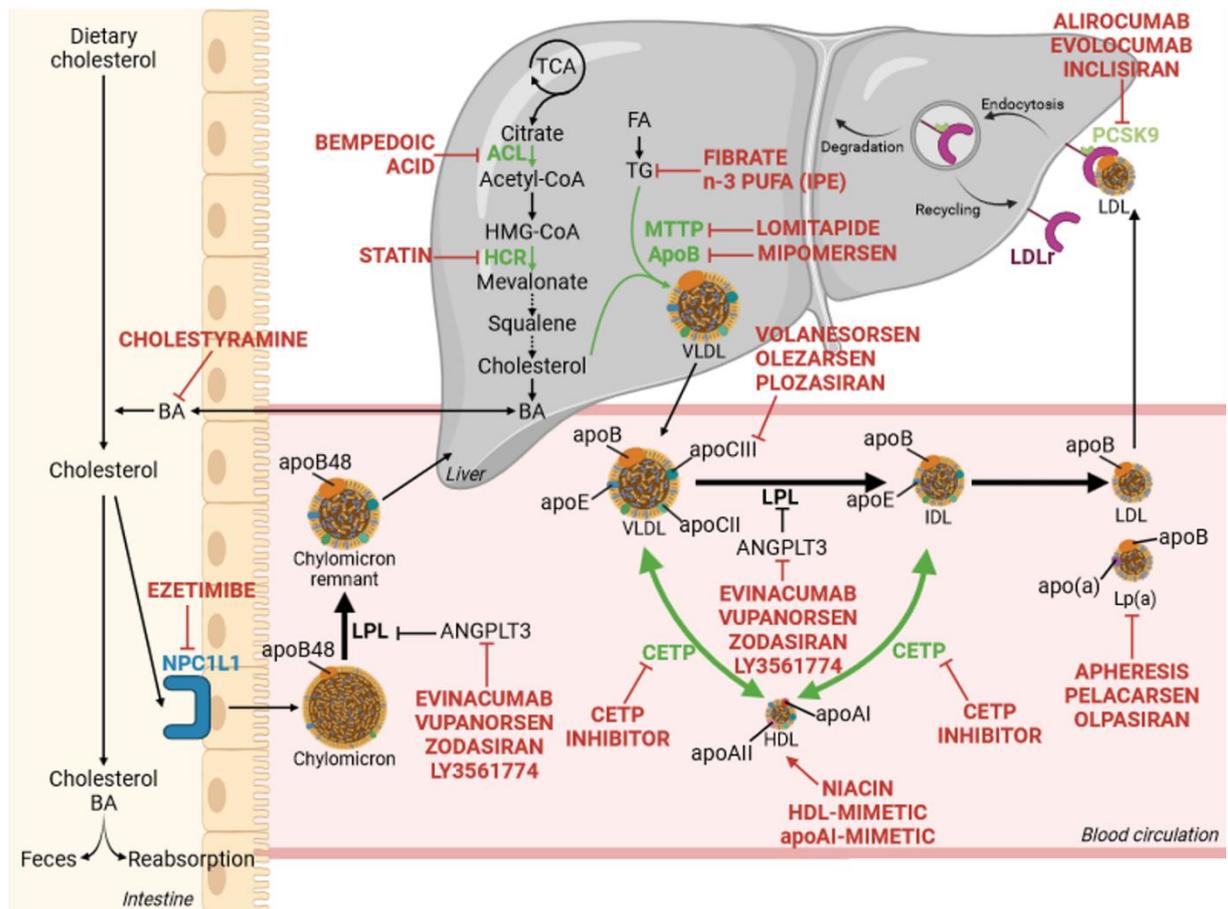


Figure 2: Therapeutic drugs tested in the management of dyslipidemia to reduce CVD risk

ACL : ATP citrate lyase ; ANGPTL3 : angiopoietin-like-3 ; apo : apolipoprotein ; BA : bile acids ; CETP : Cholesteryl Ester Transfer Protein ; FA : fatty acids ; HCR : HMG-CoA reductase ; HDL : high density lipoprotein ; HMG-CoA : 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A ; IDL : intermediate density lipoproteins ; IPE : icosapent ethyl ; LDL : low density lipoproteins ; LDLr : LDL receptor ; Lp(a) : lipoprotein (a) ; LPL : lipoprotein lipase ; MTTP : Microsomal Triglyceride Transfer Protein ; n-3 PUFA : omega-3 polyunsaturated fatty acids ; NPC1L1 : Niemann-Pick C1-Like 1 ; PCSK9 : proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 ; TCA : tricarboxylic acid cycle ; TG : triglycerides ; VLDL : very low density lipoproteins

### Lipid-lowering agents before the statin era: failure or mitigated results of drug strategies targeting HDL or TG-rich lipoproteins on CVD prevention: niacin, cholestyramine, and fibrates

Before the statin “revolution”, researchers already tested different drugs of interest in the cardiovascular field as lipid-lowering agents. However, their efficacy on CVD events and mortality remained inconclusive. First, **niacin (nicotinic acid + vitamin)** was described in 1873 by the chemist Hugo Weidel, while studying nicotine. In 1897, Albert Ladenburg synthesized niacin by oxidation of nicotine. Niacin is also found in and synthesized from tryptophan by plants and animals. Niacin was initially used during the 1930s to treat pellagra, a disease caused by a lack of niacin due to malnutrition. In 1955, Rudolf Altschul and colleagues

discovered the lipid-lowering properties of niacin which makes it the first and oldest known lipid-lowering molecule<sup>44</sup>. However, the results of studies from the Coronary Drug Project in 1975 revealed that niacin treatment only decreased nonfatal recurrent myocardial infarction (MI) and did not significantly decrease overall mortality<sup>45</sup>. Further evaluation in several randomized clinical trials later confirmed the unlikely benefits of niacin alone on the prevention of CVD events<sup>46</sup>.

Another interesting drug was **cholestyramine** developed by the Dow Chemical Company as a water-softener in 1957. In 1965, cholestyramine resin administration was shown to significantly reduce serum TC levels in nine hypercholesterolemic patients<sup>47</sup>. Acting as a bile acid-sequestering agent in the gut (Figure 2), cholestyramine promotes fecal excretion of bile acids and thus increases conversion of cholesterol to bile acids in the liver, thereby resulting in lowered plasma LDL-C levels<sup>47,48</sup>. In 1984, results of the LRC-CPPT launched in 1973, revealed that treatment with cholestyramine significantly reduced plasma TC (8%) and LDL-C (12%) levels compared to placebo, and also significantly reduced the incidence of CVD events (19%)<sup>49</sup>. This trial was one of the first large-scale randomized trials, demonstrating the benefits of lipid-lowering therapy on CVD reduction. However, results of cholestyramine administration on progression of coronary artery disease (CAD) in the NHLBI Type II Coronary Intervention Study<sup>50</sup> and in the St Thomas' Atherosclerosis Regression Study (STARS)<sup>51</sup> were inconclusive due to the small number of patients included in these studies. The use of cholestyramine was subsequently limited due to poor patient tolerability and adverse side effects such as gastrointestinal symptoms (constipation, gas, bloating...). Interestingly, a new generation of bile acid sequestrants, such as colesevelam, was further developed to overcome gastrointestinal intolerance associated to cholestyramine. However, for the moment, no adequately powered trial has been performed to evaluate the potential benefits of colesevelam on cardiovascular risk. Thus, until now, the efficacy of bile acid sequestrant on the prevention of CVD is still uncertain.

In parallel, **fibrates** were synthesized in the mid-1950s in France, since researchers discovered cholesterol-lowering properties of some plant hormones<sup>52,53</sup>. In 1962, among many branched-chain fatty acids developed as plant hormone analogues and screened by Imperial Chemical Industries (ICI), the most effective and less toxic compound was found to be the ethyl- $\alpha$ -4-chlorophenoxyisobutyrate, also known as clofibrate<sup>54</sup>. Clofibrate treatment

decreased lipid concentrations in hypercholesterolemic patients<sup>55,56</sup>. Even though its mode of action was not clearly described and researchers were worried by hepatomegaly induced by chronic treatment in rats, clofibrate was approved in 1967 in the US for the treatment of hyperlipidemia. Small secondary prevention trials in 1971 showed promising effects of clofibrate on mortality in patients with pre-existing ischemic heart disease<sup>57,58</sup>. By modifying the structure of clofibrate, procetofen, also known as fenofibrate, was synthesized in 1974 and introduced in clinical trials the same year. Fenofibrate showed to decrease plasma lipid levels in hyperlipidemic patients<sup>59</sup>. At the end of the 1970s, other fibrates were also described, such as gemfibrozil<sup>60</sup> or bezafibrate<sup>61</sup>, but the clinical use of these molecules was restricted due to induction of hepatocarcinogenesis in rats and mice<sup>62</sup>, leading to reluctance to use them in humans. Interestingly, in 1983, it was demonstrated that human hepatocytes are resistant to this peroxisome proliferative effect of fibrates<sup>63</sup>, which was then confirmed by epidemiological studies in the late 90s<sup>64,65</sup>. However, in 1984, the WHO primary prevention trial conducted on 15,745 men produced surprising results with an increased mortality in patients treated with clofibrate (wide variety of causes other than CVD)<sup>66</sup>, casting doubt on the use of fibrates in CVD management. In addition, as TG were identified as risk factors for coronary events<sup>67</sup>, renewed interest in fibrates emerged in the 1990s when its mode of action through the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) was identified<sup>68</sup>. As fibrates exhibited beneficial lipid effects by reducing plasma TG levels, but also by increasing HDL-C levels, they were tested in several clinical studies on cardiovascular risk. Results of the HHS study in 1987 demonstrated that gemfibrozil reduced the incidence of CHD by 34% compared to placebo<sup>27</sup>. This effect of gemfibrozil was confirmed later in 1999 in secondary prevention in the VA-HIT trial<sup>29</sup>. Bezafibrate was also tested in 2000 in the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study, but it did not show a significant reduction of the incidence of cardiovascular events. However, post-hoc analysis of the BIP study revealed that bezafibrate decreased CVD risk in patients with high baseline TG levels ( $\geq 200$  mg/dL)<sup>69</sup>. Finally, the results of the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study, the first study to test fenofibrate on CVD risk in 9,795 participants (aged 50 to 75, exclusively with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and not taking statins), showed a reduction on cardiovascular events, mainly due to a reduction in non-fatal MI and revascularizations<sup>70</sup>. Unfortunately, fenofibrate failed to show a significant decrease in the primary outcome of coronary events. However, these results were confounded by a high

number of individuals starting statin therapy in the placebo group when the results of the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS) were published<sup>71</sup>. Thus, this trial left a mixed opinion regarding the potential use of fibrates in preventing CVD. The use of fibrates was also tested in combination with statin therapy to reduce CVD in the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) study<sup>72</sup> and more recently in the Pemafibrate to Reduce Cardiovascular Outcomes by Reducing Triglycerides in Patients With Diabetes (PROMINENT) study<sup>73,74</sup>. The results of these studies are discussed later.

### **Statins: a revolutionary lipid treatment in the management of CVD risk through LDL-C lowering**

By the end of 1970s, while searching for antimicrobial agents, Akira Endo and colleagues discovered compactin (ML-236B), also known as mevastatin, a natural product inhibitor of cholesterol synthesis produced by *Penicillium Citrinum*<sup>75,76</sup>. This discovery marked the birth of statins as powerful inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase), an enzyme that catalyses the rate-limiting step in cholesterol synthesis (Figure 2). Mevastatin became the first statin tested in a small group of individuals with heterozygous familial hypercholesterolemia (HeFH), showing high efficacy in reducing plasma concentrations of TC and LDL-C<sup>77</sup>. However, mevastatin showed toxic side effects over the long term in preclinical studies and its further development was suspended. In 1973, Joseph Goldstein and Michael Brown, winners of the Nobel Prize for Physiology or Medicine in 1985 for their discoveries concerning the regulation of cholesterol metabolism, discovered the LDL receptor (LDLr)<sup>78,79</sup>. In 1980, lovastatin was isolated from *Aspergillus terreus*<sup>80</sup>, and lovastatin treatment was found to induce the expression of LDLr, providing a mechanism of action for its plasma cholesterol-lowering activity<sup>81,82</sup>. In 1987, lovastatin was approved by the FDA, making it the first commercially available statin<sup>83</sup>. This was followed by the development of many other statins which differ in potency, lipophilicity or half-time. Simvastatin, which differs from lovastatin by an added side chain methyl group, was the second statin used clinically, being approved in Sweden in 1988. Pravastatin followed in 1991, fluvastatin in 1994, atorvastatin in 1996, and rosuvastatin in 2003<sup>84</sup>. Cerivastatin was marketed in 1997, but removed in 2001, because of substantial side effects, particularly when co-administrated with gemfibrozil. Indeed, gemfibrozil increased the plasma exposure to cerivastatin, thus leading to increased incidence of myopathy<sup>85</sup>. Since 1990, many large randomized trials have been designed to

study the effect of statins on cardiovascular risk. The first primary prevention trial was launched in 1992, in which pravastatin was tested in middle-aged men with hypercholesterolemia and no history of MI in the WOSCOPS study<sup>21</sup>. The results published in 1995 revealed that pravastatin treatment decreases the incidence of MI and death from CVD without major adverse effects<sup>22</sup>. In 1994, in the 4S study, simvastatin treatment, tested in secondary prevention, decreased LDL-C concentrations as well as fatal and non-fatal cardiovascular events<sup>23</sup>. This landmark study led to the success of statin treatment in the prevention of cardiovascular events, still today the reference treatment. In 2002, the British Heart Protection Study (HPS) was the first trial to demonstrate that even patients with low LDL-C concentrations benefited from the use of simvastatin<sup>86</sup>. Thus, adding simvastatin to existing cardioprotective treatments safely produces substantial additional benefits, irrespective of their initial cholesterol concentrations. In the 2004 CARDS study, atorvastatin treatment efficiently reduced the risk of CVD events in T2DM patients at that time considered to be with low LDL-C levels ( $\leq 160$ mg/dL)<sup>71</sup>. In parallel, the HPS<sup>86</sup> and the Cholesterol Treatment Trialists (CTT) collaboration<sup>24</sup> showed that benefits in cardiovascular (CV) events were observed in each tertile of baseline LDL-C and the greater the LDL-C reduction, the greater the relative reduction in events. Thus, the concept of “lower is better” emerged with the hypothesis that no matter what LDL-C you start with, lowering LDL-C provides further CV benefit. This hypothesis was evaluated in several clinical trials, testing high-dose versus standard-dose statins on LDL-C and CVD events, such as in Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy (PROVE IT)<sup>87</sup> and Treating to New Target (TNT)<sup>88</sup> trials. They definitively proved that the more intensive lowering of LDL-C significantly reduced CV events, and subsequently, the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guideline committee recommended a new target LDL-C of <70 mg/dl for patients at very high cardiovascular risk<sup>89</sup>. In the 2008 Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) trial in patients without hyperlipidemia, but with elevated high sensitive C-reactive protein (hsCRP) levels, rosuvastatin reduced the incidence of major cardiovascular events and decreased LDL-C, but also hsCRP levels, demonstrating for the first time the anti-inflammatory effects of statins<sup>90</sup>. However, it should be noted that statins have certain adverse effects: they can induce muscle pain and increase the risk of T2DM and hepatic transaminase levels<sup>91</sup>. Therefore, alternative treatments

to reduce cardiovascular risk in patients intolerant to statins are needed. Moreover, notwithstanding the impressive effects of statins on cardiovascular risk protection, a residual cardiovascular risk persists in many patients, leading to the development of strategies to identify residual CVD risk factors and testing statins in combination with other potential cardioprotective drugs.

### **Failure of strategies combining statins with HDL- or TG-targeted therapies: niacin, CETP inhibitors, HDL and apoA-I mimetics, fibrates**

Despite the wide use of statins, the residual cardiovascular risk persisting in many patients on statin treatment spawned testing combination treatments associating statins to control LDL-C levels with complementary drugs acting through different mechanisms, such as improving or increasing HDL-C levels and HDL function. First, researchers reconsidered the use of **niacin** in cardiovascular risk management. Indeed, as low levels of HDL-C are an independent predictor of CHD risk, and since niacin was the most widely used medication to raise HDL-C (through decreased HDL–apo A-I catabolism, concomitantly to inhibitory actions on adipose TG lipolysis and liver TG synthesis)<sup>92</sup> (Figure 2), an extended-release niacin formulation (with less risk to induce flushing) was added to intensive statin therapy to test its effect on CVD risk. Unfortunately, the results of the Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome with Low HDL/High Triglyceride and Impact on Global Health Outcomes (AIM-HIGH) study in 2011 showed no clinical benefit from the addition of niacin to intensive statin therapy on cardiovascular outcomes, despite significant improvements in HDL-C and TG<sup>93</sup>. Similarly, 3 years later, the results of the Heart Protection Study 2—Treatment to Reduce the Incidence of Vascular Events (HPS2-THRIVE) study showed that extended-release niacin combined with the prostaglandin D2 receptor antagonist laropiprant to lower flushing, added to statin therapy, did not reduce major vascular events, but increased serious adverse effects (gastrointestinal, musculoskeletal, and skin-related events as well as infection and bleeding)<sup>94</sup>, leading to the discontinuation of niacin in 2016 by the FDA.

In the late 70s and early 80s, Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) was identified. CETP promotes the transfer of cholesteryl esters from anti-atherogenic HDL to pro-atherogenic VLDL and LDL in exchange for TG, thus reducing HDL-C and increasing LDL-C levels. These led to the hypothesis that its inhibition may have atheroprotective effects<sup>95</sup>. Several preclinical<sup>96–99</sup> and

clinical reports<sup>100–103</sup> supported this hypothesis, leading to the development of the first potent **CETP inhibitor** torcetrapib (Figure 2). In 2004, early studies with torcetrapib, alone or in association with a statin, revealed that it markedly increased HDL-C and decreased LDL-C levels in patients with low baseline HDL-C<sup>104</sup>. However, despite a lot of enthusiasm, torcetrapib when associated to atorvastatin, failed to show any beneficial effect on major cardiovascular events compared to the statin alone in 2007 in the Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events (ILLUMINATE) trial<sup>105</sup>. On the contrary, torcetrapib increased mortality and morbidity from both cardiovascular and non-cardiovascular causes, leading to the premature termination of the study in 2006. In addition, torcetrapib treatment did not show any benefit on the progression of coronary atherosclerosis or carotid intima-media thickness<sup>106–108</sup>. Several reports demonstrated that the deleterious effect of torcetrapib may be due to potential off-target effects including elevated blood pressure, electrolyte abnormalities consistent with activation of the renin-angiotensin aldosterone system, increased adrenal cortisol and aldosterone synthesis, and upregulation of endothelin levels in the aortic wall. It suggested that CETP inhibitors, lacking such effects, may still be of interest in residual cardiovascular risk reduction<sup>109,110</sup>. For this reason, in subsequent years, different pharmaceutical companies developed several other CETP inhibitors without any torcetrapib-like adverse events: dalcetrapib, evacetrapib and anacetrapib. However, despite favorable effects on lipids, the development of dalcetrapib and evacetrapib was stopped in 2012 (dal-OUTCOMES study<sup>111</sup>) and 2017 (ACCELERATE study<sup>112</sup>) respectively, due to a lack of meaningful and sufficient efficacy on cardiovascular risk, making CETP inhibitors no longer of interest in the management of CVD risk. This could have been counteracted by the results of the Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib Through Lipid-modification (REVEAL) study showing that anacetrapib decreases, albeit moderately, major coronary events (only 9%) in statin-treated patients with atherosclerotic vascular disease<sup>113</sup>. However, even though the observed cardiovascular benefit was associated with increased HDL-C levels and reduced non-HDL-C levels, it was unclear whether the higher mean level of HDL-C in the anacetrapib group largely contributes to the beneficial effects on coronary events. The effects seemed rather to be beneficial in patients with higher baseline LDL-C levels, in whom the absolute reductions in LDL-C levels may be greater. Due to a lack of enthusiasm for this drug class, the development of anacetrapib was halted. Obicetrapib, another CETP

inhibitor which gained interest between 2000-2010 to increase HDL-C levels and reduce cardiovascular risk, also saw its development discontinued in 2017 despite a significant decrease in LDL-C levels. Therefore, in 2020, the development of obicetrapib continued, but this time focusing on LDL-C reduction. The results of the Randomized Study of Obicetrapib as an Adjunct to Statin Therapy (ROSE) phase II trial designed to evaluate the efficacy, safety, and tolerability of obicetrapib in patients already receiving high-intensity statin therapy, revealed that obicetrapib reduced LDL-C by 50%<sup>114</sup>. It also decreased apoB and non-HDL-C, and it increased significantly HDL-C (the secondary trial outcomes) with excellent safety and tolerability profiles. Thanks to these positive results, NewAmsterdam Pharma initiated three phase III clinical trials with obicetrapib, including the PREVAIL trial to assess its effect on the risk of major cardiovascular events in patients with history of atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) and inadequate control of LDL-C despite maximally tolerated lipid-modifying therapies (results are expected in 2026).

Alternative strategies of HDL-targeted therapies, such as injection of reconstituted **HDL mimetics** (i.e. the apoA-I-phospholipid complexes) and **mimetics of apoA-I**, the major HDL protein, were also tested rather to modulate HDL function than HDL-C levels (Figure 2). In 1974, researchers from Milan University discovered a mutated apoA-I form (apoA-I Milano) (arginine replacement by cysteine at position 173), resulting in very low levels of HDL-C (7-14 mg/dL) without any signs of premature CVD<sup>115,116</sup>. Based on preclinical studies showing that recombinant apoA-I Milano rapidly reduces atherosclerosis development through a higher cholesterol efflux<sup>117</sup>, approaches based on apoA-I infusion therapies were evaluated: 5 weekly intravenous administrations of MDCO-216, an apoA-I Milano-phosphatidylcholine complex induced regression of coronary atherosclerosis in a small phase II intravascular ultrasound (IVUS) study in 2003<sup>118</sup>. This preliminary observation provided considerable interest in approaches targeting HDL function in patients with established CVD and stimulated further efforts to develop new effective HDL mimetics. However, the phase 2 Effect of rHDL on Atherosclerosis-Safety and Efficacy (ERASE) study testing CSL111, a reconstituted HDL mimetic consisting of wild-type apoA-I isolated from human plasma, complexed with soybean phosphatidylcholine, was discontinued because of hepatic toxicity and failed to significantly reduce atheroma volume in patients with acute coronary syndrome<sup>119</sup>. In line, CER-001, a negatively charged (as natural HDL lipoproteins), engineered pre- $\beta$  HDL mimetic containing

recombinant wild-type apoA-I and sphingomyelin, despite increasing cholesterol efflux capacity<sup>120</sup>, failed to demonstrate a beneficial effect on coronary plaque regression in the Can HDL Infusions Significantly Quicken Atherosclerosis Regression (CHI-SQUARE) trial<sup>121</sup> nor in statin-treated patients with high plaque burden<sup>122</sup>. In addition, following improvement of the manufacturing processes allowing the production of large quantities of peptides<sup>123</sup>, the HDL mimetic MDCO-216 containing apoA-I Milano was re-introduced into humans. However, treating statin-treated patients following an acute coronary syndrome with this HDL mimetic failed to produce plaque regression<sup>124</sup>, despite increases in plasma free cholesterol mainly driven by enhanced cholesterol efflux capacity<sup>125–127</sup>. Thus, the use of HDL mimetics in the cardiovascular field was particularly disappointing. Moreover, parallel to the HDL mimetic peptides, two apoA-I mimetic peptides (composed of 18 amino acids compared to the 243 amino acids of human apoA-I) were designed and tested in phase 2 clinical trials in 2008 and 2011<sup>128,129</sup>. However, D-4F (made with D-amino acids) and L-4F (made with L-amino acids) failed to significantly improve biomarkers of HDL function, such as the HDL-inflammatory index or paraoxonase activity<sup>128,129</sup>. Among the HDL mimetics developed to improve HDL function, a new one, CSL112 (with improved liver safety profile than CSL111 mentioned earlier) containing native apoA-I isolated from human plasma and formulated with phosphatidylcholine was promising, exhibiting favorable pharmacological properties on cholesterol efflux parameters and increasing pre- $\beta$  HDL levels<sup>130–133</sup>. CSL112 enhances ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1)-dependent cholesterol efflux and is the only apoA-I-based product that activates lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT)<sup>134</sup>. The potential of CSL112 to reduce cardiovascular events by enhancing cholesterol efflux and thereby reducing cholesterol content and/or instability of atherosclerotic plaques was evaluated in patients with acute coronary syndrome in the phase III ApoA-I Event Reducing in Ischemic Syndromes-II (AEGIS-II) trial<sup>135</sup>. However, the results of this study recently demonstrated that CSL112 failed to improve the risk of MI, stroke, or death from cardiovascular causes compared to placebo<sup>136</sup>. Thus, despite their atheroprotective potential in animal studies<sup>137,138</sup>, the lack of detailed understanding of their molecular mechanism of action, the low number of assays reliably predicting their potential cardiovascular benefits, combined to excessive costs of their clinical use, provide further uncertainty regarding the therapeutic interest of these HDL and apoA-I mimetic candidates and, more globally, of targeting HDL functionality.

Another strategy to target HDL function is to improve reverse cholesterol transport by enhancing LCAT activity. LCAT is a plasma enzyme that catalyzes the esterification of cholesterol in lipoproteins, which is important in HDL synthesis and maturation, thus improving reverse cholesterol transport from peripheral tissues<sup>139</sup>. In 2016, two Phase I studies conducted in patients with stable CHD and low HDL-C levels or patients with familial LCAT deficiency showed that infusion of ACP-501, a **human recombinant LCAT**, was well tolerated and increased HDL metabolism<sup>140,141</sup>. In 2021, ACP-501, now called MEDI6012, increased HDL, apoA1 levels and cholesterol efflux, and decreased apoB and small LDL particles in statin treated-patients with stable CHD, supporting the potential of targeting LCAT in future CVD clinical trials<sup>142</sup>. In addition, MEDI6012 treatment also increased HDL-C, HDL cholesteryl ester, and total cholesteryl ester in patients with atherosclerosis<sup>143</sup>. However, in the Randomized, Placebo-controlled Phase 2b Study to Evaluate the Safety and Efficacy of MEDI6012 in Acute ST Elevation Myocardial Infarction (EAL-TIMI 63B), MEDI6012 did not reduce infarct size or plaque volume in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction<sup>144</sup>. More recently, in a small study conducted in 5 patients with ASCVD, MEDI6012 improved the cholesteryl ester efflux resulting in increased HDL-C levels<sup>145</sup>, which proves that further clinical studies are needed to determine its effects on cardiovascular risk.

In addition, **fibrates**, which decrease TG concentrations and increase HDL-C levels, were also reevaluated in combination with statins. Initially, the fibrate-statin combination was contraindicated, due to a potential risk of myopathy and rhabdomyolysis reported with the combination gemfibrozil-lovastatin in 1990<sup>146</sup> or gemfibrozil-cerivastatin in 2001<sup>147</sup>. This was due to drug-drug interactions, decreasing statin catabolism. This led to a warning in the prescription of a combined use of gemfibrozil and statins. However, a statin safety advisory committee regrouping the American College of Cardiology (ACC), the American Heart Association (AHA) and the NHLBI concluded on a relatively low incidence of myopathy in the use of moderate statin doses combined with a fibrate, especially when used in persons without multisystem disease or multiple medications<sup>148</sup>. In 2010, few years after the FIELD study using fenofibrate monotherapy, the addition of fenofibrate to statin treatment on CVD risk was tested in the ACCORD study in combination with simvastatin in diabetic patients<sup>72</sup>. The combination of fenofibrate and simvastatin did not reduce the rate of fatal cardiovascular events, non-fatal MI or non-fatal stroke, compared to simvastatin alone. However, post-hoc

subgroup analyses revealed heterogeneity of treatment effect according to gender (with a benefit for men) and, most importantly, a possible interaction according to baseline lipid levels, with a benefit for patients with both high basal TG ( $\geq 204$  mg/dL) and low basal HDL-C levels ( $\leq 34$  mg/dL). In 2017, a post-trial observation of the ACCORD trial, the ACCORD Follow-On (ACCORDION) study, was published, confirming the initially observed effects of fenofibrate in combination with a statin, notably the beneficial effects in the group of patients with atherogenic dyslipidemia (high TG concentration and low HDL-C)<sup>149</sup>. The results of these studies supported the use of fibrates in the management of CVD risk, particularly in subjects with atherogenic dyslipidemia. In parallel, a new generation of highly potent and selective **PPAR $\alpha$ -modulators** (SPPARM $\alpha$ ) were developed to enhance the potency, selectivity and activity of PPAR $\alpha$  agonists, while minimizing their adverse effects<sup>150</sup>. Among these SPPARM $\alpha$ , aleglitazar, a dual PPAR $\alpha/\gamma$  agonist with SPPARM $\alpha$  properties, was developed for the treatment of residual CVD risk in T2DM patients. In 2009, in the phase II SYNCHRONY study, aleglitazar treatment reduced TG and increased HDL-C levels in patients with T2DM to a higher extent than fenofibrate<sup>151</sup>, which supported its entry into a Phase III clinical trial. The AleCardio trial testing aleglitazar on CVD in secondary prevention in T2DM patients was stopped prematurely in 2014, because of a lack of cardiovascular efficacy and several adverse effects, such as gastrointestinal hemorrhages and renal dysfunction<sup>152</sup>. Another SPPARM $\alpha$  is pemafibrate developed by the Japanese company, Kowa, and approved in Japan for the treatment of hyperlipidemia in 2017. Pemafibrate is 2500 times more potent than fenofibrate and 5000 times more active on PPAR $\alpha$  than on the other isoforms PPAR $\beta/\delta$  and PPAR $\gamma$ <sup>153</sup>. In humans, alone or in combination with statins, pemafibrate reduces plasma TG levels and increases HDL-C levels in patients with atherogenic dyslipidemia<sup>154–158</sup>. Surprisingly, the PROMINENT study testing the efficacy of pemafibrate on residual cardiovascular risk after LDL-C-lowering statin therapy in patients with T2DM-related dyslipidemia<sup>73</sup>, was stopped in 2022 based on lack of efficacy in an intermediate analysis. Although pemafibrate reduced plasma levels of TG, VLDL-C, remnant cholesterol and apoC-III, the incidence of cardiovascular events was not lower in patients who received pemafibrate than in those who received placebo<sup>74</sup>. One of the possible explanations for the failure of this study is that pemafibrate increases LDL-C and apoB levels, which can offset the effect of reduced TG levels. The unexplained results of the PROMINENT

study leave doubts on a potential use of fibrates in the management of cardiovascular risk, especially in combination with statins.

### **Development of cardiovascular prevention strategies of statin combination therapy with other LDL-C lowering drugs: ezetimibe, PCSK9 targeted therapy and bempedoic acid**

**Ezetimibe** was the first new therapy for hypercholesterolemia treatment since the discovery of statins. Discovered in the mid-1990s during a program to identify new acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitors, this weak ACAT inhibitor lowered cholesterol in animals by inhibiting the absorption of cholesterol in the gut. Ezetimibe significantly decreased plasma cholesterol in humans, alone<sup>159–161</sup> or in association with statins<sup>162–166</sup>, leading to its approval in the US in 2002 as monotherapy for the treatment of hypercholesterolemia and in 2004 as a combination with simvastatin. The molecular target of ezetimibe was found to be the Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) protein<sup>167</sup> (Figure 2). In humans, NPC1L1 is expressed in the small intestine as well as in the liver, and it is responsible for cholesterol absorption in the intestine and transport of cholesterol into bile<sup>168</sup>. The results of early clinical trials in 2008 testing ezetimibe on atherosclerosis progression were not promising for its future in cardiovascular risk prevention<sup>169,170</sup>. Indeed, in these studies, the ezetimibe and simvastatin combination did not reduce aortic stenosis as well as the carotid-artery intima–media thickness in patients with familial hypercholesterolemia. However, in 2011, the Study of Heart and Renal Protection (SHARP) study showed that the combination of ezetimibe and simvastatin significantly decreased plasma LDL-C levels and reduced the incidence of major atherosclerotic events in patients with advanced chronic kidney disease (CKD)<sup>171</sup>. In 2015, the results of the Improved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial (IMPROVE-IT) showed that ezetimibe, added to a statin, incrementally reduced LDL-C levels and improved cardiovascular outcomes<sup>172</sup>. These findings supported the “lower is better” LDL-C concept to reduce CVD risk, and changed the guidelines, lowering the LDL-C goal from 70 mg/dL to 55 mg/dL in patients at very-high CV risk<sup>173</sup>. Combination of statin and ezetimibe is now recommended as a simple, effective and inexpensive therapeutic solution to reach the LDL-C target goal. Consequently, experts now recommend this association as a first intention to obtain a rapid reduction in LDL-C in very high cardiovascular

risk patients<sup>174</sup>. However, researchers tried to identify other therapeutic strategies to decrease LDL-C levels with the aim to further lower cardiovascular risk.

In addition to ezetimibe, **Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9 (PCSK9) targeted therapies** have been developed in recent years. In 2003, Boileau *et al* discovered PCSK9 while searching for genes involved in familial hypercholesterolemia<sup>175</sup>. After binding to the LDLr, PCSK9 blocks LDLr recycling to the membrane, thus decreasing the number of LDLr on the cell surface. Consequently, PCSK9 inhibition emerged as a new target to lower LDL-C levels (Figure 2). This strategy was confirmed in 2007 when treatment of hypercholesterolemic mice with antisense oligonucleotide (ASO) targeting PCSK9 mRNA thus altering the synthesis of PCSK9 protein, decreased TC and LDL-C levels<sup>176</sup>. In 2015, alirocumab and evolocumab, two monoclonal antibodies against PCSK9, were approved by the FDA as a treatment to lower LDL-C levels in adults with HeFH or clinical ASCVD. Both of these antibodies inhibit the binding of PCSK9 to the LDLr, thus decreasing plasma LDL-C levels. The efficacy of evolocumab and alirocumab in reducing cardiovascular risk was evaluated in two-large trials. In 2017, the results of the Further Cardiovascular Outcomes Research with PCSK9 Inhibition in Subjects with Elevated Risk (FOURIER) trial revealed that inhibition of PCSK9 with evolocumab in statin-treated patients with ASCVD and LDL-C  $\geq$  70mg/dL, reduced plasma LDL-C levels and decreased the risk of cardiovascular events by 15 %<sup>177</sup>. In 2018, treatment with alirocumab lowered the risk of cardiovascular events in patients with previous acute coronary syndrome and receiving high-intensity statin therapy (ODYSSEY-OUTCOMES study)<sup>178</sup>. In these trials, evolocumab and alirocumab reduced LDL-C levels to 30-40 mg/dL with an even greater decrease of CVD events compared to what was observed with ezetimibe in the IMPROVE-IT study, thus, further reinforcing the “lower is better” concept and strengthening the use of PCSK9 inhibition to manage CVD risk. The recent development of new RNA-directed therapies, such as small interfering RNA (siRNA) and ASO marked a new chapter in the history of PCSK9. Inclisiran, developed by Alnylam Pharmaceuticals, entered the clinical development phase in 2014 for the treatment of high cholesterol levels. Inclisiran binds to PCSK9 mRNA and inhibits PCSK9 gene expression. While alirocumab and evolocumab bind only extrahepatic circulating PCSK9 and inhibit the effect of PCSK9, inclisiran reduces the hepatic synthesis of PCSK9 and, consequently, both tissue and plasma levels of this protein. Both antibodies need to be injected every 2 or 4 weeks to provide a stable reduction in LDL-C. Inclisiran, after the initial 3-

month dosing interval, is administered every 6 months, reducing the impact of treatment on the patients' quality of life. In 2020, the results of the phase III studies ORION-10 and ORION-11 revealed that inclisiran reduces plasma LDL-C levels by approximately 50% from baseline in patients with ASCVD or ASCVD risk equivalent<sup>179</sup>. Inclisiran was first approved in Europe in december 2020 and in the US one year later. In 2023, a patient-level pooled analysis of phase III trials designed to evaluate hypocholesterolemic effect of inclisiran, revealed cardiovascular potential of decreasing LDL-C levels with inclisiran<sup>180</sup>. These observations need to be confirmed in the largest ORION study, the ORION-4 study, started in 2019, evaluating the effect of inclisiran on cardiovascular outcomes in 15,000 patients with pre-existing atherosclerotic CVD (results planned for 2024). AZD8233 is a N-acetyl-galactosamine (GalNAc)-conjugated ASO directed against PCSK9 mRNA expression which acts in both the cytoplasm and the nucleus (whereas siRNAs only act in the cytoplasm). The GalNAc moiety targets the asialoglycoprotein receptor in hepatocytes thus allowing tissue-specific hepatocyte delivery. In the Phase IIb study ETESIAN, AZD8233 reduced plasma LDL-C levels by up to 79% which is the highest LDL-C lowering achieved with a PCSK9-targeted therapy (data not published)<sup>181</sup>. In addition, ASO were also chemically modified in order to improve their delivery and a Phase I study revealed that AZD0780, the first oral ASO targeting PCSK9, is effective to reduce LDL-C (data not published) and is currently tested in a Phase IIb study. Among new treatment targeting PCSK9, adnectins, such as lerodalcipeb, are small recombinant fusion proteins that bind to the PCSK9 protein (similarly to monoclonal antibodies). Lerodalcipeb significantly reduced LDL-C levels in patients with HeFH (LIBerate-HeFH study)<sup>182</sup> and more recently, in statins treated-patients with CVD or at high risk of ASCVD (LIBerate-HR study)<sup>183</sup>. Other strategies are also under development to target PCSK9 : cyclic peptides such as MK-0616 shown to decrease LDL-C levels in a Phase II trial<sup>184</sup>; vaccines against PCSK9 which are still in preclinical development<sup>185-187</sup>; and PCSK9 gene editing using CRISPR-Cas technique<sup>188</sup>. For the moment, PCSK9 is recommended in the ESC/EAS guidelines for extremely high-risk patients or in patients whose LDL-C reduction target is >80% and whose direct initiation of tritherapy combining a statin, ezetimibe and PCSK9 targeted therapy is necessary (patients with post-acute coronary syndrome and recurrent events within 2 years or presence of peripheral artery disease or polyvascular disease or coexistent multivessel CAD or familial hypercholesterolaemia)<sup>174</sup>.

Finally, **bempedoic acid** is a new non-statin molecule that interferes with cholesterol biosynthesis. It inhibits cytosolic ATP citrate lyase, an enzyme that catalyzes the conversion of citrate into acetyl-CoA, the precursor of cholesterol synthesis (Figure 1). Thus, bempedoic acid acts upstream of HMG-CoA reductase, the target of statins. Bempedoic acid is a prodrug which is activated by a hepatic enzyme, very long-chain acyl-CoA synthetase-1 (ACSVL1), almost exclusively present in hepatocytes and not present in muscle, which makes it an interesting agent for patients with statin-associated muscle symptoms. In the liver, bempedoic acid is thus converted into bempedoyl-CoA, its pharmacological active form which inhibits ATP citrate lyase. Bempedoic acid further reduced LDL-C levels added to ezetimibe therapy in statin intolerant patients (CLEAR Tranquility study)<sup>189</sup> or added to statin therapy (CLEAR Wisdom study)<sup>190</sup> and was safe and well-tolerated<sup>191,192</sup>. In 2023, the CLEAR outcomes study reported that bempedoic acid reduced the risk of adverse cardiovascular events in high vascular risk patients with statin intolerance and elevated LDL-C levels<sup>193,194</sup>. Based on these positive results, bempedoic acid was approved by the European Medicine Agency (EMA) in January 2020, alone or in association with ezetimibe for the treatment of hypercholesterolemia and mixed dyslipidemia, and in February 2020 by the FDA for the treatment of HeFH or established ASCVD in patients who do not reach LDL-C target values.

### **Omega-3 fatty acids on CVD prevention: an old story still relevant?**

The story of n-3 FA (omega-3 fatty acids) began in the late 1970s when two Danish researchers, Dyerberg J and Bang HO, intrigued by a significantly lower incidence of cardiovascular events among Greenland Eskimos than among Danes, found that the lipid profile of Eskimos was healthier than that of Danes, despite a particularly high-fat diet. They attributed this paradoxical phenomenon to the high consumption of n-3 FA contained in marine products, especially eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5 n-3) and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3)<sup>195,196</sup>. At the same time, a study focusing on Japanese diet suggested that the low prevalence of CVD in Japan might be explained by the high consumption of fish<sup>197</sup>. In 1989, the results of the Diet and Reinfarction Trial (DART) were published, showing that a modest intake of fatty fish reduced all-cause mortality by 29% in men with previous MI<sup>198</sup>. 10 years later, in 1999, the Italian study Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico-Prevenzione (GISSI) was the first trial assessing the impact of fish oil supplements,

and not dietary change, in patients with previous MI<sup>199</sup>. This study showed that treatment with n-3 PUFA reduced death, non-fatal MI, and stroke, in patients with previous MI. An expanded analysis of the GISSI study was published in 2002 and demonstrated that the effects occurred very quickly (only 3 months)<sup>200</sup>. Yet, clinical studies focused on the administration of n-3 FA mixture and not on the specific administration of EPA or DHA. The first decade of the 21st century was marked by two major randomized controlled trials, the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS) in 2007<sup>201</sup> and the GISSI-Heart Failure (GISSI-HF) trial in 2008<sup>202</sup>. The JELIS study demonstrated that treatment with EPA induced a 19% reduction in major coronary events in Japanese hypercholesterolemic patients. GISSI-HF demonstrated that n-3 FA slightly improve morbidity and mortality in patients with heart failure. The benefits of n-3 FA in cardiovascular risk lost interest following the failure of several clinical studies such as A Study of Cardiovascular Events in Diabetes (ASCEND)<sup>203</sup>, The VITamin D and OmegA-3 Trial (VITAL)<sup>204</sup> and STatin Residual Risk Reduction With EpaNova in HiGh CV Risk PatientS With Hypertriglyceridemia (STRENGTH) trial<sup>205</sup>. Especially, the STRENGTH study reported that combined treatment of EPA and DHA did not reduce major adverse cardiovascular in statin-treated patients with high cardiovascular risk, high TG, and low HDL cholesterol levels<sup>205</sup>. By contrast, the Reduction of Cardiovascular Events With Icosapent Ethyl–Intervention Trial (REDUCE-IT) put the spotlight back on n-3 FA by showing that treatment with icosapent ethyl (IPE), a pure ester form of EPA, reduced cardiovascular events by 25% in statin-treated patients with hypertriglyceridemia and high residual cardiovascular risk<sup>206</sup>. Interestingly, the decrease of cardiovascular events by EPA was independent of its TG-lowering effect. To explain the contrasting results between trials, it was suggested that EPA and DHA exert multiple distinct biological effects. Moreover, the exposure to EPA was not sufficient in the STRENGTH trial to exert beneficial effects on cardiovascular risk in contrast to EPA alone in REDUCE-IT and JELIS studies<sup>201,207</sup>. Thus, a better understanding of the mechanisms of action involved in cardiovascular protection induced by EPA, but not DHA, is required.

### **What is next?**

At present, several clinical studies have proved the reality of the “lower is better” concept. Therefore, LDL-C lowering *per se* is still the main driver of CVD risk reduction and guidelines focus on combination therapy with statins to achieve LDL-C goals. However, new strategies

targeting different aspects of lipid and lipoprotein homeostasis to decrease residual cardiovascular risk are underway.

#### Drugs targeting apoB-containing lipoproteins

In the 1980s, the work of Wetterau and Zilversmit identified that Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTTP), through the transfer of TG to apoB, assembles VLDL in the liver<sup>208–210</sup>. In the 1990s, genetic studies revealed that a defect in MTTP due to mutation in the MTTP gene caused abetalipoproteinemia and confirmed that MTTP is required for lipoprotein assembly<sup>211</sup>. Thus, MTTP became an interesting therapeutic target to reduce LDL-C especially in homozygous familial hypercholesterolemia (HoFH). The first drug targeting MTTP entering in clinical development was BMS-201038, now known as **lomitapide** (Figure 2). In the cytosol and the endoplasmic reticulum, lomitapide directly binds to MTTP and inhibits its activity, thus preventing the assembly of apoB-containing lipoproteins in the liver and in the intestine. The inhibition of VLDL secretion in the liver and chylomicrons in the intestine can further reduce plasma LDL-C levels in a manner that is independent of the LDLr. In 2007, Aegerion Pharmaceuticals acquired rights to the molecule and used it as a therapy for HoFH. Positive results of clinical studies with lomitapide in patients with HoFH led to its approval by the FDA and EMA in 2012 and 2013 as an adjunct to other lipid-lowering drugs<sup>212,213</sup>. Modelling analysis suggested that lomitapide increases life expectancy and time to first MACE in patients with HoFH. The Lomitapide Observational Worldwide Evaluation Registry (LOWER) revealed the safety and efficacy of lomitapide to reduce LDL-C levels<sup>214,215</sup>. Further studies on cardiovascular outcomes are needed to evaluate the potential efficacy of lomitapide on CVD.

ApoB is the key structural protein present in chylomicrons, VLDL, IDL and LDL. The importance of apoB in lipoprotein metabolism was established by genetic studies of familial hypobetalipoproteinemia<sup>216</sup>. FHBL is characterized by low levels of LDL-C due to a truncated form of apoB<sup>217</sup>. This discovery in 1988 spawned the idea of inhibiting apoB synthesis to reduce plasma LDL-C levels. **Mipomersen** is an ASO interfering with apoB100 mRNA, thus lowering the production of apoB100 protein in the liver (Figure 2). Evaluated in clinical studies during the same period as lomitapide, it was tested in different populations and not only in patients with HoFH<sup>218–222</sup>. Thus, mipomersen reduced LDL-C levels in patients with mild dyslipidemia (TC<300 mg/dL)<sup>218</sup>, hypercholesterolemia<sup>219</sup>, HeFH<sup>220</sup> and HoFH<sup>221</sup> already taking lipid-

lowering therapy or mild-to-moderate hyperlipidemia ( $119 < \text{LDL-C} < 266 \text{ mg/dL}$ )<sup>222</sup>. Therefore, the FDA also approved mipomersen in 2013 as adjunctive therapy to other lipid-lowering therapies in patients with HoFH. In 2016, post-hoc analysis of three randomized trials and one open-label extension phase study suggested that mipomersen reduces risk of MACE in patients with familial hypercholesterolemia<sup>223</sup>. However, a recent meta-analysis of 13 randomized controlled trials revealed that mipomersen was associated with hepatic enzyme elevation and increased hepatic steatosis<sup>224</sup>. Further investigations on liver toxicity and cardiovascular outcomes are thus required to assess the risk-benefit of mipomersen.

### Drugs targeting Lp(a)

Lp(a) (Lipoprotein (a)) is a lipoprotein with a similar structure as LDL, but with apo(a) covalently bound to apoB100. It was discovered in 1963 by the Norwegian physician and geneticist, Kare Berg<sup>225</sup>. Until the 70s, patients were classified as "Lp(a)-positive" or "Lp(a)-negative" and already at that time, a higher prevalence of CVD was observed in Lp(a)-positive individuals<sup>226</sup>. In addition, Lp(a) was considered as highly atherogenic because it was found within atherosclerotic lesions<sup>227</sup>. In 1970s, Lp(a) was quantified and shown to be present in every individual, but at higher or lower concentrations<sup>228,229</sup>. In the early 90s, observations from the PROCAM<sup>230</sup> and Framingham<sup>231</sup> studies confirmed that increased Lp(a) concentrations are a significant independent risk factor for MI and CAD. Unfortunately, in 1993, a prospective study published by Ridker and colleagues concluded that Lp(a) levels are not associated with future risk of MI<sup>232</sup>, which kept Lp(a) in the shadow for the next 15 years. Ten years later, high levels of Lp(a) and the size of apo(a) were demonstrated to determine the risk of angina pectoris<sup>233</sup>. A few years later, two important reports from Copenhagen showed the causal role of Lp(a) as a CVD risk factor<sup>234,235</sup>. Then, in 2010, the EAS Consensus Panel reconsidered elevated Lp(a) as an independent cardiovascular risk factor and recommended a "desirable level for Lp(a) <80th percentile, i.e., less than approximately 50 mg/dl"<sup>236</sup>. Today, Lp(a) represents an interesting therapeutic target for the management of CVD and several drugs already used in cardiovascular risk such as inclisiran, a PCSK9 inhibitor, or obicetrapib, a CETP inhibitor, were found to decrease Lp(a). In late 2000s-early 2010s, two studies revealed that **lipoprotein apheresis** decrease Lp(a) levels as well as the incidence of cardiovascular events<sup>237-239</sup>. However, since apheresis decreases both LDL-C and Lp(a), it was not possible to differentiate their relative effects on cardiovascular outcomes. An apheresis method, which

decreases only Lp(a) levels, was shown to reduce coronary atherosclerosis (based on the diameter stenosis and minimal lumen diameter)<sup>240</sup> and the intima media thickness<sup>241</sup>, supporting the important role of Lp(a) in CVD. Worldwide, lipoprotein apheresis is commonly used to decrease LDL-C. Since 2008, it is also approved in Germany to reduce Lp(a) levels in patients with recurrent ASCVD events, independent of baseline LDL-C levels<sup>242</sup>. In addition, new drugs directly targeting Lp(a) based on RNA-interference therapies are developed in the last few years. Among them, **pelacarsen** is an ASO targeting apo(a) which significantly decreases Lp(a) levels with neutral effects on LDL-C in individuals with hyperlipoproteinemia(a) and established CVD<sup>243,244</sup>. Pelacarsen is currently tested in the Phase III Assessing the Impact of Lipoprotein (a) Lowering With Pelacarsen (TQJ230) on Major Cardiovascular Events in Patients With CVD (Lp(a)HORIZON) study to evaluate its effect on the risk of MACE in 8,000 patients with elevated Lp(a) and established CVD (NCT04023552, started in december 2019). siRNA technology is also used to target Lp(a) through apo(a). **Olpasiran**, a siRNA directed against the apo(a) mRNA inhibits the assembly of Lp(a) (Figure 2), significantly reduces apo(a) levels in patients with established ASCVD<sup>245</sup>, and is now tested in the Olpasiran Trials of Cardiovascular Events and Lipoprotein(a) Reduction (OCEAN(a)) phase III study evaluating the effect of olpasiran on cardiovascular risk in 6,000 patients with ASCVD and elevated Lp(a) (NCT05581303, started in December 2022). **SLN360** is another siRNA directed against apo(a) mRNA expression which already showed its safety and efficacy on plasma Lp(a) levels in a Phase I study<sup>246</sup> and is currently in a phase II study to assess its effectiveness in patients with elevated Lp(a) concentrations and high cardiovascular risk (NCT04606602). **Lepodisiran** (LY3819469), another siRNA, was also well tolerated and decreased plasma Lp(a) levels in patients with high Lp(a) levels<sup>247</sup>, and is currently in phase II study (NCT05565742).

#### Drugs targeting TG-rich lipoproteins and their remnants

ApoCIII was discovered by Brown et al in 1969 as a regulator of blood TG-rich lipoproteins<sup>248</sup> by inhibiting lipoprotein lipase (LPL)<sup>249</sup>. In 2014, two genetic observation studies revealed that loss-of-function mutations in the apoCIII gene are associated with decreased circulating TG levels and decreased CVD risk<sup>250,251</sup>. Thus, apoCIII gained a lot of attention and now represents an interesting therapeutic target for cardiovascular risk management. **Volanesorsen** is a second generation ASO targeting apoCIII mRNA hence blocking apoCIII protein synthesis (Figure 2). The results of the APPROACH<sup>252</sup> and the

COMPASS<sup>253</sup> studies revealed that volanesorsen strongly decreases plasma TG levels (approximately 70%) in patients with chylomicronemia, leading to its approval in 2019 in Europe by the EMA as an orphan drug for the treatment of familial chylomicronemia syndrome. However, volanesorsen treatment induces side effects mainly thrombocytopenia (developed in 76% of patients in the APPROACH study)<sup>254</sup>. **Olezarsen** (also known as KCEA-APOCIII-LR) is a GalNAc-conjugated ASO which, in contrast to volanesorsen, targets the liver to interfere with hepatic apoCIII mRNA expression only and inhibit hepatic apoCIII protein production. This targeted approach may also minimize its potential side effects<sup>255,256</sup>. In a small Phase II study in patients with 200<fasting TG<500mg/dL at high risk for ASCVD or with established ASCVD (CAD, stroke, or peripheral artery disease), olezarsen efficiently reduced apoCIII, TG, LDL-C, non-HDL-C, VLDL-C and apoB<sup>256</sup>. In the recent Phase IIb Bridge-TIMI (Thrombolysis in Myocardial Infarction) 73a trial, olezarsen treatment also reduces TG, apoB and non-HDL-C in patients with moderate hypertriglyceridemia (150-500 mg/dL) and high cardiovascular risk<sup>257</sup>. Finally, in the Phase IIb trial SHASTA-2 trial, **plozasiran**, a siRNA directed against apoCIII, efficiently decreases apoCIII, TG and non-HDL-C levels and increases HDL-C levels in patients with severe hypertriglyceridemia<sup>258</sup>. Plozasiran treatment also reduces TG levels in patients with mixed dyslipidemia in the MUIR study<sup>259</sup>. Despite their interesting effects on lipids, the impact of volanesorsen, olezarsen and plozasiran on CVD still needs to be determined.

Angiopoietin-like 3 (ANGPTL3), identified in 1999 on the basis of searches of assembled expressed sequence tag databases, regulates TG and cholesterol metabolism, via the inhibition of LPL<sup>260-262</sup>. ANGPTL3 also regulates HDL-C metabolism via the inhibition of endothelial lipase<sup>263</sup>. In late 2000s, genetic studies demonstrated an association between loss-of-function genetic variants in the ANGPTL3 gene and low levels of plasma LDL-C, HDL-C, and TG<sup>264-266</sup>. The mechanism by which ANGPTL3 reduced plasma LDL-C still needs to be clarified<sup>267</sup>. However, given its beneficial effect on LDL-C, strategies targeting ANGPTL3 began to emerge. **Evinacumab** is a human monoclonal antibody directed against ANGPTL3 designed by Regeneron Pharmaceuticals Inc. (Figure 2). In 2017, Dewey FE and colleagues demonstrated that, in addition to lowering levels of TG, HDL-C and LDL-C, loss-of-function variants in ANGPTL3 or its pharmacological inhibition with evinacumab also decreased ASCVD risk in humans and in mice<sup>268</sup>. In 2020, evinacumab was shown to reduce LDL-C levels in the phase

III Evinacumab Lipid Studies in Patients with HoHF (ELIPSE-HoHF) study<sup>269,270</sup>. These positive results led to its approval by FDA in february 2021 and by EMA in june 2021 for the treatment of HoFH. Moreover, in the open-label extension of ELIPSE-HoHF (OLE ELIPSE HoFH), the addition of evinacumab to lipid-lowering therapy reduced LDL-C in patients with HoFH and no CVD events was observed<sup>271</sup>. Two GalNAc-conjugated siRNA, **zodasiran** and **LY3561774**, currently under development, also target ANGPTL3 mRNA<sup>181</sup>. Zodasiran decreased TG and LDL-C levels in a Phase I study<sup>272,273</sup> and recently, in the Phase IIb Study of ARO-ANG3 in Adults With Mixed Dyslipidemia (ARCHES-2), zodasiran decreased TG levels in a dose-dependent manner<sup>274</sup>. **Vupanorsen**, a GalNAc-conjugated ASO directed against hepatic ANGPTL3 mRNA, significantly decreased plasma levels of TG and VLDL in patients with diabetes, hepatic steatosis, and hypertriglyceridaemia (TG >150 mg/dL)<sup>275</sup> as well as in statin-treated patients with hypercholesterolemia (non-HDL-C $\geq$ 100 mg/dL and 150<TG<500 mg/dL)<sup>276</sup> but its effect on LDL-C levels was weak and it induced off-target effects with hepatic steatosis accumulation, thus its development was stopped. Finally, as for PCSK9, CRISPR-Cas technology to delete ANGPTL3 expression is also tested in animals and induced a significant decrease of LDL-C levels<sup>277</sup>. Among these techniques, the VERVE-201 Phase 1b clinical trial will soon be initiated.

### **Conclusion**

To conclude, the Framingham Heart Study allowed researchers to expand their knowledge of CVD and spawned the development of optimal treatments for these pathologies. The control of cholesterol and lipids in general remains a mainstay in cardiovascular risk management. Since 1975, a huge number of clinical trials have been designed to test lipid-lowering therapies on cardiovascular outcomes, leading to the approval of the reference treatment, statins, but also of other LDL-C targeted drugs in association with statins or in case of statin intolerance, such as ezetimibe, PCSK9 targeted therapy or bempedoic acid. A summary of the main successful or unsuccessful Phase III clinical trials to manage dyslipidemia and cardiovascular risk is presented in figure 3. Important medicine progresses with the design of new therapies such as antibodies, ARO- and ASO-based therapies, which target new pathways exerting an important role on cardiovascular risk. Moreover, since 2010s, lipid-drug conjugates and more specifically liposomes and HDL-nanoparticles gained interest to improve the properties of drugs and enhance the efficiency of drug delivery systems. *In vitro* and *in vivo* studies revealed promising results for the use of liposomes<sup>278-282</sup> or HDL-nanoparticles<sup>283-</sup>

<sup>286</sup> as drug delivers in CVD, but their efficacy on cardiovascular outcomes and tolerance have to be assessed in human studies. Finally, even though lipids contribute to cardiovascular risk, inflammation is also a strong predictor of future cardiovascular events<sup>287–291</sup>. Thus, patient-tailored personalized medicine associating lipid-lowering drugs and inflammation-inhibiting therapies for optimal management of CVD risk, across the population of heart disease patients.

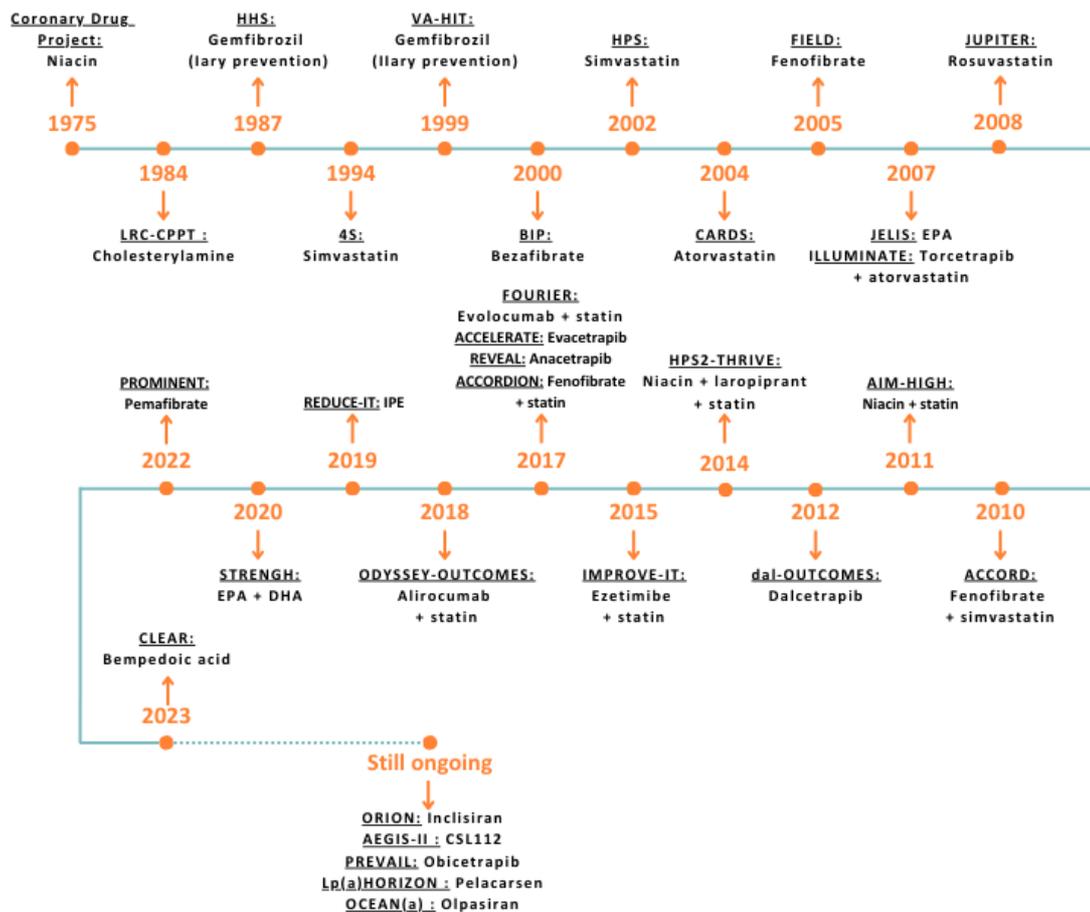


Figure 3: Main phase III clinical trials to manage dyslipidemia in cardiovascular risk

## REFERENCES

1. Cardiovascular diseases. <https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases>.
2. Dawber, T. R., Moore, F. E. & Mann, G. V. Coronary heart disease in the Framingham study. *Am. J. Public Health Nations Health* **47**, 4–24 (1957).
3. Kannel, W. B., Dawber, T. R., Kagan, A., Revotskie, N. & Stokes, J. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* **55**, 33–50 (1961).

4. Doyle, J. T., Dawber, T. R., Kannel, W. B., Heslin, A. S. & Kahn, H. A. Cigarette smoking and coronary heart disease. Combined experience of the Albany and Framingham studies. *N. Engl. J. Med.* **266**, 796–801 (1962).
5. Doyle, J. T., Dawber, T. R., Kannel, W. B., Kinch, S. H. & Kahn, H. A. THE RELATIONSHIP OF CIGARETTE SMOKING TO CORONARY HEART DISEASE; THE SECOND REPORT OF THE COMBINED EXPERIENCE OF THE ALBANY, NY. AND FRAMINGHAM, MASS. STUDIES. *JAMA* **190**, 886–890 (1964).
6. Kannel, W. B. Habitual level of physical activity and risk of coronary heart disease: the Framingham study. *Can. Med. Assoc. J.* **96**, 811–812 (1967).
7. Kannel, W. B., LeBauer, E. J., Dawber, T. R. & McNamara, P. M. Relation of body weight to development of coronary heart disease. The Framingham study. *Circulation* **35**, 734–744 (1967).
8. Castelli, W. P., Abbott, R. D. & McNamara, P. M. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circulation* **67**, 730–734 (1983).
9. Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B. & Dawber, T. R. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am. J. Med.* **62**, 707–714 (1977).
10. Feinleib, M., Kannel, W. B., Garrison, R. J., McNamara, P. M. & Castelli, W. P. The Framingham Offspring Study. Design and preliminary data. *Prev. Med.* **4**, 518–525 (1975).
11. Kannel, W. B., Hjortland, M. & Castelli, W. P. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am. J. Cardiol.* **34**, 29–34 (1974).
12. Kannel, W. B. & McGee, D. L. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* **241**, 2035–2038 (1979).
13. Kannel, W. B., Hjortland, M. C., McNamara, P. M. & Gordon, T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann. Intern. Med.* **85**, 447–452 (1976).
14. Lowering blood cholesterol to prevent heart disease. NIH Consensus Development Conference statement. *Arterioscler. Dallas Tex* **5**, 404–412 (1985).
15. Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. The Expert Panel. *Arch. Intern. Med.* **148**, 36–69 (1988).

16. Wilson, P. W. *et al.* Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* **97**, 1837–1847 (1998).
17. Splansky, G. L. *et al.* The Third Generation Cohort of the National Heart, Lung, and Blood Institute's Framingham Heart Study: design, recruitment, and initial examination. *Am. J. Epidemiol.* **165**, 1328–1335 (2007).
18. Psaty, B. M. *et al.* Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Consortium: Design of prospective meta-analyses of genome-wide association studies from 5 cohorts. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2**, 73–80 (2009).
19. Levy, D. 60 years studying heart-disease risk. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 715 (2008).
20. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. I. Reduction in incidence of coronary heart disease. *JAMA* **251**, 351–364 (1984).
21. A coronary primary prevention study of Scottish men aged 45-64 years: trial design. The West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *J. Clin. Epidemiol.* **45**, 849–860 (1992).
22. Shepherd, J. *et al.* Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1301–1307 (1995).
23. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet Lond. Engl.* **344**, 1383–1389 (1994).
24. Baigent, C. *et al.* Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet Lond. Engl.* **366**, 1267–1278 (2005).
25. Gordon, D. J. *et al.* High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* **79**, 8–15 (1989).
26. Jacobs, D. R., Mebane, I. L., Bangdiwala, S. I., Criqui, M. H. & Tyroler, H. A. High density lipoprotein cholesterol as a predictor of cardiovascular disease mortality in men and women: the follow-up study of the Lipid Research Clinics Prevalence Study. *Am. J. Epidemiol.* **131**, 32–47 (1990).
27. Frick, M. H. *et al.* Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **317**, 1237–1245 (1987).

28. Downs, J. R. *et al.* Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* **279**, 1615–1622 (1998).
29. Rubins, H. B. *et al.* 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**, 410–418 (1999).
30. Prospective Studies Collaboration *et al.* Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet Lond. Engl.* **370**, 1829–1839 (2007).
31. Jung, E., Kong, S. Y., Ro, Y. S., Ryu, H. H. & Shin, S. D. Serum Cholesterol Levels and Risk of Cardiovascular Death: A Systematic Review and a Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **19**, 8272 (2022).
32. Madsen, C. M., Varbo, A. & Nordestgaard, B. G. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies. *Eur. Heart J.* **38**, 2478–2486 (2017).
33. Liu, C., Dhindsa, D., Almuwaqqat, Z., Sun, Y. V. & Quyyumi, A. A. Very High High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels and Cardiovascular Mortality. *Am. J. Cardiol.* **188**, 120–121 (2023).
34. Austin, M. A. Plasma triglyceride and coronary heart disease. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.* **11**, 2–14 (1991).
35. Hokanson, J. E. & Austin, M. A. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J. Cardiovasc. Risk* **3**, 213–219 (1996).
36. Assmann, G., Schulte, H., Funke, H. & von Eckardstein, A. The emergence of triglycerides as a significant independent risk factor in coronary artery disease. *Eur. Heart J.* **19 Suppl M**, M8-14 (1998).
37. Jeppesen, J., Hein, H. O., Suadicani, P. & Gyntelberg, F. Triglyceride concentration and ischemic heart disease: an eight-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Circulation* **97**, 1029–1036 (1998).

38. Sarwar, N. *et al.* Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* **115**, 450–458 (2007).
39. Nordestgaard, B. G., Benn, M., Schnohr, P. & Tybjaerg-Hansen, A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* **298**, 299–308 (2007).
40. Bansal, S. *et al.* Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* **298**, 309–316 (2007).
41. Freiberg, J. J., Tybjaerg-Hansen, A., Jensen, J. S. & Nordestgaard, B. G. Nonfasting triglycerides and risk of ischemic stroke in the general population. *JAMA* **300**, 2142–2152 (2008).
42. Zilversmit, D. B. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* **60**, 473–485 (1979).
43. Ginsberg, H. N. *et al.* Triglyceride-rich lipoproteins and their remnants: metabolic insights, role in atherosclerotic cardiovascular disease, and emerging therapeutic strategies—a consensus statement from the European Atherosclerosis Society. *Eur. Heart J.* **42**, 4791–4806 (2021).
44. Altschul, R., Hoffer, A. & Stephen, J. D. Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man. *Arch. Biochem. Biophys.* **54**, 558–559 (1955).
45. Clofibrate and niacin in coronary heart disease. *JAMA* **231**, 360–381 (1975).
46. Schandelmaier, S. *et al.* Niacin for primary and secondary prevention of cardiovascular events. *Cochrane Database Syst. Rev.* **6**, CD009744 (2017).
47. Hashim, S. A. & Vanitallie, T. B. CHOLESTYRAMINE RESIN THERAPY FOR HYPERCHOLESTEREMIA: CLINICAL AND METABOLIC STUDIES. *JAMA* **192**, 289–293 (1965).
48. Staels, B. & Fonseca, V. A. Bile Acids and Metabolic Regulation. *Diabetes Care* **32**, S237–S245 (2009).
49. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *JAMA* **251**, 365–374 (1984).

50. Brensike, J. F. *et al.* Effects of therapy with cholestyramine on progression of coronary arteriosclerosis: results of the NHLBI Type II Coronary Intervention Study. *Circulation* **69**, 313–324 (1984).
51. Watts, G. F. *et al.* Effects on coronary artery disease of lipid-lowering diet, or diet plus cholestyramine, in the St Thomas' Atherosclerosis Regression Study (STARS). *Lancet Lond. Engl.* **339**, 563–569 (1992).
52. Cottet, J., Vignalou, J., Redel, J. & Colas-Belcour, null. [Hypocholesteremia-inducing properties of phenylethyl acetic acid (22TH) and phenylmethyl acetic acid (4082TH)]. *Bull. Mem. Soc. Med. Hop. Paris* **69**, 903–908 (1953).
53. Mathivat, A. & Cottet, J. [Clinical trials on the hypocholesteremia-producing effect of 2-phenylbutyric acid]. *Bull. Mem. Soc. Med. Hop. Paris* **69**, 1030–1048 (1953).
54. Thorp, J. M. & Waring, W. S. Modification of metabolism and distribution of lipids by ethyl chlorophenoxyisobutyrate. *Nature* **194**, 948–949 (1962).
55. Oliver, M. F. FURTHER OBSERVATIONS ON THE EFFECTS OF ATROMID AND OF ETHYL CHLOROPHENOXYISOBUTYRATE ON SERUM LIPID LEVELS. *J. Atheroscler. Res.* **3**, 427–444 (1963).
56. Hellman, L. *et al.* REDUCTION OF SERUM CHOLESTEROL AND LIPIDS BY ETHYL CHLOROPHENOXYISOBUTYRATE. *J. Atheroscler. Res.* **3**, 454–466 (1963).
57. Trial of clofibrate in the treatment of ischaemic heart disease. Five-year study by a group of physicians of the Newcastle upon Tyne region. *Br. Med. J.* **4**, 767–775 (1971).
58. Research Committee of the Scottish Society of Physicians. Ischaemic heart disease: a secondary prevention trial using clofibrate. Report by a research committee of the Scottish Society of Physicians. *Br. Med. J.* **4**, 775–784 (1971).
59. Matzkies, F., Schulzky, D. & Berg, G. [Procetofen, a new lipid- and urine-acid-reducing substance]. *Fortschr. Med.* **96**, 1939–1941 (1978).
60. Creger, P. L., Moersch, G. W. & Neuklis, W. A. Structure/activity relationship of gemfibrozil (CI-719) and related compounds. *Proc. R. Soc. Med.* **69 Suppl 2**, 3–5 (1976).
61. Stork, H. & Lang, P. D. Some characteristics of a new hypolipidaemic agent—BM 15.075. *Lipids Lipoproteins Drugs* 485 (1975).
62. Reddy, J. K., Azarnoff, D. L. & Hignite, C. E. Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens. *Nature* **283**, 397–398 (1980).

63. Blümcke, S. *et al.* Influence of fenofibrate on cellular and subcellular liver structure in hyperlipidemic patients. *Atherosclerosis* **46**, 105–116 (1983).
64. Bentley, P. *et al.* Hepatic peroxisome proliferation in rodents and its significance for humans. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **31**, 857–907 (1993).
65. Cattley, R. C. *et al.* Do peroxisome proliferating compounds pose a hepatocarcinogenic hazard to humans? *Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP* **27**, 47–60 (1998).
66. WHO cooperative trial on primary prevention of ischaemic heart disease with clofibrate to lower serum cholesterol: final mortality follow-up. Report of the Committee of Principal Investigators. *Lancet Lond. Engl.* **2**, 600–604 (1984).
67. Assmann, G. & Schulte, H. The Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. *Am. Heart J.* **116**, 1713–1724 (1988).
68. Issemann, I. & Green, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**, 645–650 (1990).
69. Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study. Secondary prevention by raising HDL cholesterol and reducing triglycerides in patients with coronary artery disease. *Circulation* **102**, 21–27 (2000).
70. Keech, A. *et al.* Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **366**, 1849–1861 (2005).
71. Colhoun, H. M. *et al.* Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **364**, 685–696 (2004).
72. ACCORD Study Group *et al.* Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1563–1574 (2010).
73. Pradhan, A. D. *et al.* Rationale and design of the Pemafibrate to Reduce Cardiovascular Outcomes by Reducing Triglycerides in Patients with Diabetes (PROMINENT) study. *Am. Heart J.* **206**, 80–93 (2018).
74. Das Pradhan, A. *et al.* Triglyceride Lowering with Pemafibrate to Reduce Cardiovascular Risk. *N. Engl. J. Med.* **387**, 1923–1934 (2022).

75. Endo, A., Kuroda, M. & Tsujita, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot. (Tokyo)* **29**, 1346–1348 (1976).
76. Endo, A., Tsujita, Y., Kuroda, M. & Tanzawa, K. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Eur. J. Biochem.* **77**, 31–36 (1977).
77. Mabuchi, H. *et al.* Effect of an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on serum lipoproteins and ubiquinone-10-levels in patients with familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* **305**, 478–482 (1981).
78. Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 2804–2808 (1973).
79. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 788–792 (1974).
80. Alberts, A. W. *et al.* Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 3957–3961 (1980).
81. Ma, P. T. *et al.* Mevinolin, an inhibitor of cholesterol synthesis, induces mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of hamsters and rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 8370–8374 (1986).
82. Ness, G. C., Zhao, Z. & Lopez, D. Inhibitors of cholesterol biosynthesis increase hepatic low-density lipoprotein receptor protein degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* **325**, 242–248 (1996).
83. Endo, A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **86**, 484–493 (2010).
84. Hajar, R. Statins: past and present. *Heart Views Off. J. Gulf Heart Assoc.* **12**, 121–127 (2011).
85. Backman, J. T., Kyrklund, C., Neuvonen, M. & Neuvonen, P. J. Gemfibrozil greatly increases plasma concentrations of cerivastatin. *Clin. Pharmacol. Ther.* **72**, 685–691 (2002).

86. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **360**, 7–22 (2002).
87. Cannon, C. P. *et al.* Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1495–1504 (2004).
88. LaRosa, J. C. *et al.* Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1425–1435 (2005).
89. Grundy, S. M. *et al.* Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* **110**, 227–239 (2004).
90. Ridker, P. M. *et al.* Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2195–2207 (2008).
91. Ruscica, M., Ferri, N., Banach, M., Sirtori, C. R. & Corsini, A. Side effects of statins: from pathophysiology and epidemiology to diagnostic and therapeutic implications. *Cardiovasc. Res.* **118**, 3288–3304 (2023).
92. Kamanna, V. S. & Kashyap, M. L. Mechanism of action of niacin. *Am. J. Cardiol.* **101**, 20B–26B (2008).
93. Boden, W. E. *et al.* Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2255–2267 (2011).
94. Landray, M. J. *et al.* Effects of extended-release niacin with laropirant in high-risk patients. *N. Engl. J. Med.* **371**, 203–212 (2014).
95. Brown, M. L. *et al.* Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature* **342**, 448–451 (1989).
96. Sugano, M. *et al.* Effect of antisense oligonucleotides against cholesteryl ester transfer protein on the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J. Biol. Chem.* **273**, 5033–5036 (1998).
97. Rittershaus, C. W. *et al.* Vaccine-induced antibodies inhibit CETP activity in vivo and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 2106–2112 (2000).
98. Okamoto, H. *et al.* A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature* **406**, 203–207 (2000).

99. Morehouse, L. A. *et al.* Inhibition of CETP activity by torcetrapib reduces susceptibility to diet-induced atherosclerosis in New Zealand White rabbits. *J. Lipid Res.* **48**, 1263–1272 (2007).
100. Inazu, A. *et al.* Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N. Engl. J. Med.* **323**, 1234–1238 (1990).
101. Barter, P. J. *et al.* Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 160–167 (2003).
102. Thompson, A. *et al.* Association of cholesteryl ester transfer protein genotypes with CETP mass and activity, lipid levels, and coronary risk. *JAMA* **299**, 2777–2788 (2008).
103. Johannsen, T. H., Frikke-Schmidt, R., Schou, J., Nordestgaard, B. G. & Tybjaerg-Hansen, A. Genetic inhibition of CETP, ischemic vascular disease and mortality, and possible adverse effects. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 2041–2048 (2012).
104. Me, B. *et al.* Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *N. Engl. J. Med.* **350**, (2004).
105. Barter, P. J. *et al.* Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2109–2122 (2007).
106. Nissen, S. E. *et al.* Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1304–1316 (2007).
107. Bots, M. L. *et al.* Torcetrapib and carotid intima-media thickness in mixed dyslipidaemia (RADIANCE 2 study): a randomised, double-blind trial. *Lancet Lond. Engl.* **370**, 153–160 (2007).
108. Kastelein, J. J. P. *et al.* Effect of torcetrapib on carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1620–1630 (2007).
109. Barter, P. Lessons learned from the Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events (ILLUMINATE) trial. *Am. J. Cardiol.* **104**, 10E–5E (2009).
110. Vergeer, M. & Stroes, E. S. G. The pharmacology and off-target effects of some cholesterol ester transfer protein inhibitors. *Am. J. Cardiol.* **104**, 32E–8E (2009).
111. Schwartz, G. G. *et al.* Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N. Engl. J. Med.* **367**, 2089–2099 (2012).

112. Lincoff, A. M. *et al.* Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1933–1942 (2017).
113. Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1217–1227 (2017).
114. Nicholls, S. J. *et al.* Lipid lowering effects of the CETP inhibitor obicetrapib in combination with high-intensity statins: a randomized phase 2 trial. *Nat. Med.* **28**, 1672–1678 (2022).
115. Franceschini, G., Sirtori, C. R., Capurso, A., Weisgraber, K. H. & Mahley, R. W. A-I Milano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J. Clin. Invest.* **66**, 892–900 (1980).
116. Weisgraber, K. H., Bersot, T. P., Mahley, R. W., Franceschini, G. & Sirtori, C. R. A-I Milano apoprotein. Isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the A-I apoprotein from human high density lipoproteins. *J. Clin. Invest.* **66**, 901–907 (1980).
117. Shah, P. K. *et al.* High-dose recombinant apolipoprotein A-I(milano) mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein e-deficient mice. Potential implications for acute plaque stabilization. *Circulation* **103**, 3047–3050 (2001).
118. Nissen, S. E. *et al.* Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* **290**, 2292–2300 (2003).
119. Tardif, J.-C. *et al.* Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA* **297**, 1675–1682 (2007).
120. Zheng, K. H. *et al.* HDL mimetic CER-001 targets atherosclerotic plaques in patients. *Atherosclerosis* **251**, 381–388 (2016).
121. Tardif, J.-C. *et al.* Effects of the high-density lipoprotein mimetic agent CER-001 on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized trial. *Eur. Heart J.* **35**, 3277–3286 (2014).
122. Nicholls, S. J. *et al.* Effect of Serial Infusions of CER-001, a Pre- $\beta$  High-Density Lipoprotein Mimetic, on Coronary Atherosclerosis in Patients Following Acute Coronary

Syndromes in the CER-001 Atherosclerosis Regression Acute Coronary Syndrome Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol.* **3**, 815–822 (2018).

123. Caparon, M. H. *et al.* Integrated solution to purification challenges in the manufacture of a soluble recombinant protein in *E. coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **105**, 239–249 (2010).

124. Nicholls, S. J. *et al.* Effect of Infusion of High-Density Lipoprotein Mimetic Containing Recombinant Apolipoprotein A-I Milano on Coronary Disease in Patients With an Acute Coronary Syndrome in the MILANO-PILOT Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol.* **3**, 806–814 (2018).

125. Kempen, H. J. *et al.* Persistent changes in lipoprotein lipids after a single infusion of ascending doses of MDCO-216 (apoA-IMilano/POPC) in healthy volunteers and stable coronary artery disease patients. *Atherosclerosis* **255**, 17–24 (2016).

126. Kallend, D. G. *et al.* A single infusion of MDCO-216 (ApoA-1 Milano/POPC) increases ABCA1-mediated cholesterol efflux and pre-beta 1 HDL in healthy volunteers and patients with stable coronary artery disease. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Pharmacother.* **2**, 23–29 (2016).

127. Kempen, H. J. *et al.* High-Density Lipoprotein Subfractions and Cholesterol Efflux Capacities After Infusion of MDCO-216 (Apolipoprotein A-IMilano/Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholine) in Healthy Volunteers and Stable Coronary Artery Disease Patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 736–742 (2016).

128. Bloedon, L. T. *et al.* Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral apoA-I mimetic peptide D-4F in high-risk cardiovascular patients. *J. Lipid Res.* **49**, 1344–1352 (2008).

129. Watson, C. E. *et al.* Treatment of patients with cardiovascular disease with L-4F, an apo-A1 mimetic, did not improve select biomarkers of HDL function. *J. Lipid Res.* **52**, 361–373 (2011).

130. Diditchenko, S. *et al.* Novel formulation of a reconstituted high-density lipoprotein (CSL112) dramatically enhances ABCA1-dependent cholesterol efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 2202–2211 (2013).

131. Gille, A., Easton, R., D'Andrea, D., Wright, S. D. & Shear, C. L. CSL112 enhances biomarkers of reverse cholesterol transport after single and multiple infusions in healthy subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 2106–2114 (2014).
132. Tricoci, P. *et al.* Infusion of Reconstituted High-Density Lipoprotein, CSL112, in Patients With Atherosclerosis: Safety and Pharmacokinetic Results From a Phase 2a Randomized Clinical Trial. *J. Am. Heart Assoc.* **4**, e002171 (2015).
133. Michael Gibson, C. *et al.* Safety and Tolerability of CSL112, a Reconstituted, Infusible, Plasma-Derived Apolipoprotein A-I, After Acute Myocardial Infarction: The AEGIS-I Trial (ApoA-I Event Reducing in Ischemic Syndromes I). *Circulation* **134**, 1918–1930 (2016).
134. Korjian, S. *et al.* Biological basis and proposed mechanism of action of CSL112 (apolipoprotein A-I [human]) for prevention of major adverse cardiovascular events in patients with myocardial infarction. *Eur. Heart J. — Cardiovasc. Pharmacother.* **9**, 387–398 (2023).
135. Gibson, C. M. *et al.* Rationale and design of ApoA-I Event Reducing in Ischemic Syndromes II (AEGIS-II): A phase 3, multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study to investigate the efficacy and safety of CSL112 in subjects after acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* **231**, 121–127 (2021).
136. Gibson, C. M. *et al.* Apolipoprotein A1 Infusions and Cardiovascular Outcomes after Acute Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* **390**, 1560–1571 (2024).
137. Morgantini, C. *et al.* Apolipoprotein A-I Mimetic Peptides Prevent Atherosclerosis Development and Reduce Plaque Inflammation in a Murine Model of Diabetes. *Diabetes* **59**, 3223–3228 (2010).
138. Ou, Z.-J. *et al.* Apolipoprotein A-I mimetic peptide inhibits atherosclerosis by altering plasma metabolites in hypercholesterolemia. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **303**, E683–694 (2012).
139. Czarnecka, H. & Yokoyama, S. Regulation of cellular cholesterol efflux by lecithin:cholesterol acyltransferase reaction through nonspecific lipid exchange. *J. Biol. Chem.* **271**, 2023–2028 (1996).
140. Shamburek, R. D. *et al.* Safety and Tolerability of ACP-501, a Recombinant Human Lecithin:Cholesterol Acyltransferase, in a Phase 1 Single-Dose Escalation Study. *Circ. Res.* **118**, 73–82 (2016).

141. Shamburek, R. D. *et al.* Safety and Tolerability of ACP-501, a Recombinant Human Lecithin:Cholesterol Acyltransferase, in a Phase 1 Single-Dose Escalation Study. *Circ. Res.* **118**, 73–82 (2016).
142. George, R. T. *et al.* MEDI6012: Recombinant Human Lecithin Cholesterol Acyltransferase, High-Density Lipoprotein, and Low-Density Lipoprotein Receptor-Mediated Reverse Cholesterol Transport. *J. Am. Heart Assoc.* **10**, e014572 (2021).
143. Bonaca, M. P. *et al.* Recombinant human lecithin-cholesterol acyltransferase in patients with atherosclerosis: phase 2a primary results and phase 2b design. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Pharmacother.* **8**, 243–252 (2022).
144. Bonaca, M. P. *et al.* Randomized, Placebo-Controlled Phase 2b Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Recombinant Human Lecithin Cholesterol Acyltransferase in Acute ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction: Results of REAL-TIMI 63B. *Circulation* **146**, 907–916 (2022).
145. Reyes-Soffer, G. *et al.* Effects of Recombinant Human Lecithin Cholesterol Acyltransferase on Lipoprotein Metabolism in Humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **44**, 1407–1418 (2024).
146. Pierce, L. R., Wysowski, D. K. & Gross, T. P. Myopathy and rhabdomyolysis associated with lovastatin-gemfibrozil combination therapy. *JAMA* **264**, 71–75 (1990).
147. Bruno-Joyce, J., Dugas, J. M. & MacCausland, O. E. Cerivastatin and gemfibrozil-associated rhabdomyolysis. *Ann. Pharmacother.* **35**, 1016–1019 (2001).
148. Pasternak, R. C. *et al.* ACC/AHA/NHLBI clinical advisory on the use and safety of statins. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40**, 567–572 (2002).
149. Elam, M. B. *et al.* Association of Fenofibrate Therapy With Long-term Cardiovascular Risk in Statin-Treated Patients With Type 2 Diabetes. *JAMA Cardiol.* **2**, 370–380 (2017).
150. Fruchart, J.-C. Selective peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$  modulators (SPPARM $\alpha$ ): The next generation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -agonists. *Cardiovasc. Diabetol.* **12**, 82 (2013).
151. Henry, R. R. *et al.* Effect of the dual peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ / $\gamma$  agonist aleglitazar on risk of cardiovascular disease in patients with type 2

diabetes (SYNCHRONY): a phase II, randomised, dose-ranging study. *Lancet Lond. Engl.* **374**, 126–135 (2009).

152. Lincoff, A. M. *et al.* Effect of aleglitazar on cardiovascular outcomes after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes mellitus: the AleCardio randomized clinical trial. *JAMA* **311**, 1515–1525 (2014).

153. Takizawa, T. *et al.* Abstract 12867: The Mechanism of K-877, a Highly Potent and Selective Pparalpha Modulator, on Regulation of Synthesis, Secretion and Metabolism of Triglycerides and Cholesterol. *Circulation* **128**, A12867–A12867 (2013).

154. Ishibashi, S. *et al.* Effects of K-877, a novel selective PPAR $\alpha$  modulator (SPPARM $\alpha$ ), in dyslipidaemic patients: A randomized, double blind, active- and placebo-controlled, phase 2 trial. *Atherosclerosis* **249**, 36–43 (2016).

155. Arai, H. *et al.* Efficacy and safety of K-877, a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  modulator (SPPARM $\alpha$ ), in combination with statin treatment: Two randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trials in patients with dyslipidaemia. *Atherosclerosis* **261**, 144–152 (2017).

156. Arai, H. *et al.* Efficacy and Safety of Pemafibrate Versus Fenofibrate in Patients with High Triglyceride and Low HDL Cholesterol Levels: A Multicenter, Placebo-Controlled, Double-Blind, Randomized Trial. *J. Atheroscler. Thromb.* **25**, 521–538 (2018).

157. Ishibashi, S. *et al.* Efficacy and safety of pemafibrate (K-877), a selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  modulator, in patients with dyslipidemia: Results from a 24-week, randomized, double blind, active-controlled, phase 3 trial. *J. Clin. Lipidol.* **12**, 173–184 (2018).

158. Ginsberg, H. N. *et al.* Efficacy and Safety of K-877 (Pemafibrate), a Selective PPAR $\alpha$  Modulator, in European Patients on Statin Therapy. *Diabetes Care* **45**, 898–908 (2022).

159. Bays, H. E. *et al.* Effectiveness and tolerability of ezetimibe in patients with primary hypercholesterolemia: pooled analysis of two phase II studies. *Clin. Ther.* **23**, 1209–1230 (2001).

160. Dujovne, C. A. *et al.* Efficacy and safety of a potent new selective cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in patients with primary hypercholesterolemia. *Am. J. Cardiol.* **90**, 1092–1097 (2002).

161. Knopp, R. H. *et al.* Effects of ezetimibe, a new cholesterol absorption inhibitor, on plasma lipids in patients with primary hypercholesterolemia. *Eur. Heart J.* **24**, 729–741 (2003).
162. Gagné, C. *et al.* Efficacy and safety of ezetimibe added to ongoing statin therapy for treatment of patients with primary hypercholesterolemia. *Am. J. Cardiol.* **90**, 1084–1091 (2002).
163. Davidson, M. H. *et al.* Ezetimibe coadministered with simvastatin in patients with primary hypercholesterolemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40**, 2125–2134 (2002).
164. Kerzner, B. *et al.* Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with lovastatin in primary hypercholesterolemia. *Am. J. Cardiol.* **91**, 418–424 (2003).
165. Melani, L. *et al.* Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with pravastatin in patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. *Eur. Heart J.* **24**, 717–728 (2003).
166. Ballantyne, C. M. *et al.* Effect of ezetimibe coadministered with atorvastatin in 628 patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. *Circulation* **107**, 2409–2415 (2003).
167. Garcia-Calvo, M. *et al.* The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 8132–8137 (2005).
168. Jia, L., Betters, J. L. & Yu, L. Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) Protein in Intestinal and Hepatic Cholesterol Transport. *Annu. Rev. Physiol.* **73**, 239–259 (2011).
169. Rossebø, A. B. *et al.* Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1343–1356 (2008).
170. Kastelein, J. J. P. *et al.* Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1431–1443 (2008).
171. Baigent, C. *et al.* The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **377**, 2181–2192 (2011).
172. Cannon, C. P. *et al.* Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2387–2397 (2015).
173. Mach, F. *et al.* 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur. Heart J.* **41**, 111–188 (2020).

174. Ray, K. K. *et al.* Combination lipid-lowering therapy as first-line strategy in very high-risk patients. *Eur. Heart J.* **43**, 830–833 (2022).
175. Abifadel, M. *et al.* Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **34**, 154–156 (2003).
176. Graham, M. J. *et al.* Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J. Lipid Res.* **48**, 763–767 (2007).
177. Sabatine, M. S. *et al.* Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1713–1722 (2017).
178. Schwartz, G. G. *et al.* Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **379**, 2097–2107 (2018).
179. Ray, K. K. *et al.* Two Phase 3 Trials of Inclisiran in Patients with Elevated LDL Cholesterol. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1507–1519 (2020).
180. Ray, K. K. *et al.* Inclisiran and cardiovascular events: a patient-level analysis of phase III trials. *Eur. Heart J.* **44**, 129–138 (2023).
181. Brandts, J. & Ray, K. K. Novel and future lipid-modulating therapies for the prevention of cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **20**, 600–616 (2023).
182. Raal, F. *et al.* Long-term efficacy and safety of lerodalcibep in heterozygous familial hypercholesterolaemia: the LIBerate-HeFH trial. *Eur. Heart J.* **44**, 4272–4280 (2023).
183. Klug, E. Q. *et al.* Efficacy and Safety of Lerodalcibep in Patients With or at High Risk of Cardiovascular Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol.* e241659 (2024) doi:10.1001/jamacardio.2024.1659.
184. Ballantyne, C. M. *et al.* Phase 2b Randomized Trial of the Oral PCSK9 Inhibitor MK-0616. *J. Am. Coll. Cardiol.* **81**, 1553–1564 (2023).
185. Crossey, E. *et al.* A cholesterol-lowering VLP vaccine that targets PCSK9. *Vaccine* **33**, 5747–5755 (2015).
186. Pan, Y. *et al.* A Therapeutic Peptide Vaccine Against PCSK9. *Sci. Rep.* **7**, 12534 (2017).
187. Zeitlinger, M. *et al.* A phase I study assessing the safety, tolerability, immunogenicity, and low-density lipoprotein cholesterol-lowering activity of immunotherapeutics targeting PCSK9. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **77**, 1473–1484 (2021).

188. Musunuru, K. *et al.* In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates. *Nature* **593**, 429–434 (2021).
189. Ballantyne, C. M. *et al.* Efficacy and safety of bempedoic acid added to ezetimibe in statin-intolerant patients with hypercholesterolemia: A randomized, placebo-controlled study. *Atherosclerosis* **277**, 195–203 (2018).
190. Goldberg, A. C. *et al.* Effect of Bempedoic Acid vs Placebo Added to Maximally Tolerated Statins on Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Patients at High Risk for Cardiovascular Disease: The CLEAR Wisdom Randomized Clinical Trial. *JAMA* **322**, 1780–1788 (2019).
191. Ray, K. K. *et al.* Safety and Efficacy of Bempedoic Acid to Reduce LDL Cholesterol. *N. Engl. J. Med.* **380**, 1022–1032 (2019).
192. Laufs, U. *et al.* Efficacy and Safety of Bempedoic Acid in Patients With Hypercholesterolemia and Statin Intolerance. *J. Am. Heart Assoc.* **8**, e011662 (2019).
193. Nicholls, S. *et al.* Rationale and design of the CLEAR-outcomes trial: Evaluating the effect of bempedoic acid on cardiovascular events in patients with statin intolerance. *Am. Heart J.* **235**, 104–112 (2021).
194. Nissen, S. E. *et al.* Bempedoic Acid and Cardiovascular Outcomes in Statin-Intolerant Patients. *N. Engl. J. Med.* **388**, 1353–1364 (2023).
195. Dyerberg, J., Bang, H. O., Stoffersen, E., Moncada, S. & Vane, J. R. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet Lond. Engl.* **2**, 117–119 (1978).
196. Bang, H. O., Dyerberg, J. & Sinclair, H. M. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**, 2657–2661 (1980).
197. Hirai, A. *et al.* Eicosapentaenoic acid and platelet function in Japanese. *Lancet Lond. Engl.* **2**, 1132–1133 (1980).
198. Burr, M. L. *et al.* Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet Lond. Engl.* **2**, 757–761 (1989).
199. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet Lond. Engl.* **354**, 447–455 (1999).

200. Marchioli, R. *et al.* Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation* **105**, 1897–1903 (2002).
201. Yokoyama, M. *et al.* Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet Lond. Engl.* **369**, 1090–1098 (2007).
202. Tavazzi L *et al.* Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **372**, (2008).
203. ASCEND Study Collaborative Group *et al.* Effects of n-3 Fatty Acid Supplements in Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* **379**, 1540–1550 (2018).
204. Manson, J. E. *et al.* Marine n-3 Fatty Acids and Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *N. Engl. J. Med.* **380**, 23–32 (2019).
205. Nicholls, S. J. *et al.* Effect of High-Dose Omega-3 Fatty Acids vs Corn Oil on Major Adverse Cardiovascular Events in Patients at High Cardiovascular Risk: The STRENGTH Randomized Clinical Trial. *JAMA* **324**, 2268–2280 (2020).
206. Bhatt, D. L. *et al.* Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *N. Engl. J. Med.* **380**, 11–22 (2019).
207. Mason, R. P., Libby, P. & Bhatt, D. L. Emerging Mechanisms of Cardiovascular Protection for the Omega-3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **40**, (2020).
208. Wetterau, J. R. & Zilversmit, D. B. A triglyceride and cholesteryl ester transfer protein associated with liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **259**, 10863–10866 (1984).
209. Wettereau, J. R. & Zilversmit, D. B. Purification and characterization of microsomal triglyceride and cholesteryl ester transfer protein from bovine liver microsomes. *Chem. Phys. Lipids* **38**, 205–222 (1985).
210. Wetterau, J. R. & Zilversmit, D. B. Localization of intracellular triacylglycerol and cholesteryl ester transfer activity in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **875**, 610–617 (1986).

211. Wetterau, J. R. *et al.* Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* **258**, 999–1001 (1992).
212. Cuchel, M. *et al.* Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a single-arm, open-label, phase 3 study. *The Lancet* **381**, 40–46 (2013).
213. Rader, D. J. & Kastelein, J. J. P. Lomitapide and Mipomersen. *Circulation* **129**, 1022–1032 (2014).
214. Blom, D. J. *et al.* Long-Term Efficacy and Safety of the Microsomal Triglyceride Transfer Protein Inhibitor Lomitapide in Patients With Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *Circulation* **136**, 332–335 (2017).
215. Underberg, J. A. *et al.* Long-term safety and efficacy of lomitapide in patients with homozygous familial hypercholesterolemia: Five-year data from the Lomitapide Observational Worldwide Evaluation Registry (LOWER). *J. Clin. Lipidol.* **14**, 807–817 (2020).
216. Schonfeld, G., Lin, X. & Yue, P. Familial hypobetalipoproteinemia: genetics and metabolism. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **62**, 1372–1378 (2005).
217. Young, S. G., Northey, S. T. & McCarthy, B. J. Low plasma cholesterol levels caused by a short deletion in the apolipoprotein B gene. *Science* **241**, 591–593 (1988).
218. Kastelein, J. J. P. *et al.* Potent reduction of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol by short-term administration of an antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Circulation* **114**, 1729–1735 (2006).
219. Akdim, F. *et al.* Efficacy and safety of mipomersen, an antisense inhibitor of apolipoprotein B, in hypercholesterolemic subjects receiving stable statin therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**, 1611–1618 (2010).
220. Akdim, F. *et al.* Effect of mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, on low-density lipoprotein cholesterol in patients with familial hypercholesterolemia. *Am. J. Cardiol.* **105**, 1413–1419 (2010).
221. Raal, F. J. *et al.* Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **375**, 998–1006 (2010).

222. Akdim, F. *et al.* Efficacy of apolipoprotein B synthesis inhibition in subjects with mild-to-moderate hyperlipidaemia. *Eur. Heart J.* **32**, 2650–2659 (2011).
223. Duell, P. B. *et al.* Long-term mipomersen treatment is associated with a reduction in cardiovascular events in patients with familial hypercholesterolemia. *J. Clin. Lipidol.* **10**, 1011–1021 (2016).
224. Fogacci, F. *et al.* Efficacy and Safety of Mipomersen: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Drugs* **79**, 751–766 (2019).
225. Berg, K. A NEW SERUM TYPE SYSTEM IN MAN—THE Lp SYSTEM. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **59**, 369–382 (1963).
226. Berg, K., Dahlén, G. & Frick, M. H. Lp(a) lipoprotein and pre-beta1-lipoprotein in patients with coronary heart disease. *Clin. Genet.* **6**, 230–235 (1974).
227. Walton, K. W., Hitchens, J., Magnani, H. N. & Khan, M. A study of methods of identification and estimation of Lp(a) lipoprotein and of its significance in health, hyperlipidaemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **20**, 323–346 (1974).
228. Albers, J. J. & Hazzard, W. R. Immunochemical quantification of human plasma Lp(a) lipoprotein. *Lipids* **9**, 15–26 (1974).
229. Albers, J. J., Adolphson, J. L. & Hazzard, W. R. Radioimmunoassay of human plasma Lp(a) lipoprotein. *J. Lipid Res.* **18**, 331–338 (1977).
230. Sandkamp, M., Funke, H., Schulte, H., Köhler, E. & Assmann, G. Lipoprotein(a) is an independent risk factor for myocardial infarction at a young age. *Clin. Chem.* **36**, 20–23 (1990).
231. Genest, J. *et al.* Lipoprotein cholesterol, apolipoprotein A-I and B and lipoprotein (a) abnormalities in men with premature coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **19**, 792–802 (1992).
232. Ridker, P. M., Hennekens, C. H. & Stampfer, M. J. A prospective study of lipoprotein(a) and the risk of myocardial infarction. *JAMA* **270**, 2195–2199 (1993).
233. Rifai, N. *et al.* Apolipoprotein(a) size and lipoprotein(a) concentration and future risk of angina pectoris with evidence of severe coronary atherosclerosis in men: The Physicians' Health Study. *Clin. Chem.* **50**, 1364–1371 (2004).

234. Kamstrup, P. R., Benn, M., Tybjaerg-Hansen, A. & Nordestgaard, B. G. Extreme lipoprotein(a) levels and risk of myocardial infarction in the general population: the Copenhagen City Heart Study. *Circulation* **117**, 176–184 (2008).
235. Kamstrup, P. R., Tybjaerg-Hansen, A., Steffensen, R. & Nordestgaard, B. G. Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA* **301**, 2331–2339 (2009).
236. Nordestgaard, B. G. *et al.* Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur. Heart J.* **31**, 2844–2853 (2010).
237. Jaeger, B. R. *et al.* Longitudinal cohort study on the effectiveness of lipid apheresis treatment to reduce high lipoprotein(a) levels and prevent major adverse coronary events. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **6**, 229–239 (2009).
238. Leebmann, J. *et al.* Lipoprotein apheresis in patients with maximally tolerated lipid-lowering therapy, lipoprotein(a)-hyperlipoproteinemia, and progressive cardiovascular disease: prospective observational multicenter study. *Circulation* **128**, 2567–2576 (2013).
239. Roeseler, E. *et al.* Lipoprotein Apheresis for Lipoprotein(a)-Associated Cardiovascular Disease: Prospective 5 Years of Follow-Up and Apolipoprotein(a) Characterization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 2019–2027 (2016).
240. Safarova, M. S. *et al.* Effect of specific lipoprotein(a) apheresis on coronary atherosclerosis regression assessed by quantitative coronary angiography. *Atheroscler. Suppl.* **14**, 93–99 (2013).
241. Ezhov, M. V. *et al.* Specific Lipoprotein(a) apheresis attenuates progression of carotid intima-media thickness in coronary heart disease patients with high lipoprotein(a) levels. *Atheroscler. Suppl.* **18**, 163–169 (2015).
242. Schettler, V. *et al.* Current view: indications for extracorporeal lipid apheresis treatment. *Clin. Res. Cardiol. Suppl.* **7**, 15–19 (2012).
243. Tsimikas, S. *et al.* Lipoprotein(a) Reduction in Persons with Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **382**, 244–255 (2020).
244. Yeang, C. *et al.* Effect of Pelacarsen on Lipoprotein(a) Cholesterol and Corrected Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *J. Am. Coll. Cardiol.* **79**, 1035–1046 (2022).
245. O’Donoghue, M. L. *et al.* Small Interfering RNA to Reduce Lipoprotein(a) in Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **387**, 1855–1864 (2022).

246. Nissen, S. E. *et al.* Single Ascending Dose Study of a Short Interfering RNA Targeting Lipoprotein(a) Production in Individuals With Elevated Plasma Lipoprotein(a) Levels. *JAMA* **327**, 1679–1687 (2022).
247. Nissen, S. E. *et al.* Lepodisiran, an Extended-Duration Short Interfering RNA Targeting Lipoprotein(a): A Randomized Dose-Ascending Clinical Trial. *JAMA* **330**, 2075–2083 (2023).
248. Brown, W. V., Levy, R. I. & Fredrickson, D. S. Studies of the proteins in human plasma very low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **244**, 5687–5694 (1969).
249. Brown, W. V. & Baginsky, M. L. Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 375–382 (1972).
250. Jørgensen, A. B., Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B. G. & Tybjaerg-Hansen, A. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *N. Engl. J. Med.* **371**, 32–41 (2014).
251. TG and HDL Working Group of the Exome Sequencing Project, National Heart, Lung, and Blood Institute *et al.* Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N. Engl. J. Med.* **371**, 22–31 (2014).
252. Witztum, J. L. *et al.* Volanesorsen and Triglyceride Levels in Familial Chylomicronemia Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **381**, 531–542 (2019).
253. Gouni-Berthold, I. *et al.* Efficacy and safety of volanesorsen in patients with multifactorial chylomicronaemia (COMPASS): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **9**, 264–275 (2021).
254. Khetarpal, S. A., Wang, M. & Khera, A. V. Volanesorsen, Familial Chylomicronemia Syndrome, and Thrombocytopenia. *N. Engl. J. Med.* **381**, 2582–2584 (2019).
255. Alexander, V. J. *et al.* N-acetyl galactosamine-conjugated antisense drug to APOC3 mRNA, triglycerides and atherogenic lipoprotein levels. *Eur. Heart J.* **40**, 2785–2796 (2019).
256. Tardif, J.-C. *et al.* Apolipoprotein C-III reduction in subjects with moderate hypertriglyceridaemia and at high cardiovascular risk. *Eur. Heart J.* **43**, 1401–1412 (2022).
257. Bergmark, B. A. *et al.* Olezarsen for Hypertriglyceridemia in Patients at High Cardiovascular Risk. *N. Engl. J. Med.* **390**, 1770–1780 (2024).

258. Gaudet, D. *et al.* Plozasiran (ARO-APOC3) for Severe Hypertriglyceridemia: The SHASTA-2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol.* **9**, 620–630 (2024).
259. Ballantyne, C. M. *et al.* Plozasiran, an RNA Interference Agent Targeting APOC3, for Mixed Hyperlipidemia. *N. Engl. J. Med.* (2024) doi:10.1056/NEJMoa2404143.
260. Conklin, D. *et al.* Identification of a Mammalian Angiopoietin-Related Protein Expressed Specifically in Liver. *Genomics* **62**, 477–482 (1999).
261. Koishi, R. *et al.* Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nat. Genet.* **30**, 151–157 (2002).
262. Shimizugawa, T. *et al.* ANGPTL3 decreases very low density lipoprotein triglyceride clearance by inhibition of lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* **277**, 33742–33748 (2002).
263. Shimamura, M. *et al.* Angiopoietin-like protein3 regulates plasma HDL cholesterol through suppression of endothelial lipase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 366–372 (2007).
264. Willer, C. J. *et al.* Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat. Genet.* **40**, 161–169 (2008).
265. Romeo, S. *et al.* Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. *J. Clin. Invest.* **119**, 70–79 (2009).
266. Musunuru, K. *et al.* Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2220–2227 (2010).
267. Kersten, S. ANGPTL3 as therapeutic target. *Curr. Opin. Lipidol.* **32**, 335–341 (2021).
268. Dewey, F. E. *et al.* Genetic and Pharmacologic Inactivation of ANGPTL3 and Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 211–221 (2017).
269. Raal, F. J. *et al.* Evinacumab for Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* **383**, 711–720 (2020).
270. Raal, F. J. *et al.* The Long-Term Efficacy and Safety of Evinacumab in Patients With Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *JACC Adv.* **2**, 100648 (2023).
271. Béliard, S. *et al.* Evinacumab and Cardiovascular Outcome in Patients With Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **44**, 1447–1454 (2024).

272. Watts, G. F. *et al.* RNA interference targeting ANGPTL3 for triglyceride and cholesterol lowering: phase 1 basket trial cohorts. *Nat. Med.* **29**, 2216–2223 (2023).
273. Watts, G. F. & Chan, D. C. RNA interference therapy for targeting ANGPTL3 and atherogenic lipoproteins: Findings and implications of a recent phase I study. *Clin. Transl. Med.* **13**, e1484 (2023).
274. Rosenson, R. S. *et al.* Zodasiran, an RNAi Therapeutic Targeting ANGPTL3, for Mixed Hyperlipidemia. *N. Engl. J. Med.* (2024) doi:10.1056/NEJMoa2404147.
275. Gaudet, D. *et al.* Vupanorsen, an N-acetyl galactosamine-conjugated antisense drug to ANGPTL3 mRNA, lowers triglycerides and atherogenic lipoproteins in patients with diabetes, hepatic steatosis, and hypertriglyceridaemia. *Eur. Heart J.* **41**, 3936–3945 (2020).
276. Bergmark, B. A. *et al.* Effect of Vupanorsen on Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Statin-Treated Patients With Elevated Cholesterol: TRANSLATE-TIMI 70. *Circulation* **145**, 1377–1386 (2022).
277. Chadwick, A. C., Evitt, N. H., Lv, W. & Musunuru, K. Reduced Blood Lipid Levels With In Vivo CRISPR-Cas9 Base Editing of ANGPTL3. *Circulation* **137**, 975–977 (2018).
278. Lobatto, M. E. *et al.* Pharmaceutical development and preclinical evaluation of a GMP-grade anti-inflammatory nanotherapy. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **11**, 1133–1140 (2015).
279. van der Valk, F. M. *et al.* Prednisolone-containing liposomes accumulate in human atherosclerotic macrophages upon intravenous administration. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **11**, 1039–1046 (2015).
280. Hosseini, H. *et al.* Phosphatidylserine liposomes mimic apoptotic cells to attenuate atherosclerosis by expanding polyreactive IgM producing B1a lymphocytes. *Cardiovasc. Res.* **106**, 443–452 (2015).
281. Zhang, N. *et al.* Cyclic RGD functionalized liposomes encapsulating urokinase for thrombolysis. *Acta Biomater.* **70**, 227–236 (2018).
282. Benne, N. *et al.* Anionic 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DSPG) liposomes induce antigen-specific regulatory T cells and prevent atherosclerosis in mice. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **291**, 135–146 (2018).

283. Zhang, W. *et al.* Pharmacokinetics and atherosclerotic lesions targeting effects of tanshinone IIA discoidal and spherical biomimetic high density lipoproteins. *Biomaterials* **34**, 306–319 (2013).
284. Duivenvoorden, R. *et al.* A statin-loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticle inhibits atherosclerotic plaque inflammation. *Nat. Commun.* **5**, 3065 (2014).
285. Tang, J. *et al.* Inhibiting macrophage proliferation suppresses atherosclerotic plaque inflammation. *Sci. Adv.* **1**, e1400223 (2015).
286. Sanchez-Gaytan, B. L. *et al.* HDL-mimetic PLGA nanoparticle to target atherosclerosis plaque macrophages. *Bioconjug. Chem.* **26**, 443–451 (2015).
287. Nidorf, S. M., Eikelboom, J. W., Budgeon, C. A. & Thompson, P. L. Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **61**, 404–410 (2013).
288. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1119–1131 (2017).
289. Tardif, J.-C. *et al.* Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* **381**, 2497–2505 (2019).
290. Nidorf, S. M. *et al.* Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *N. Engl. J. Med.* **383**, 1838–1847 (2020).
291. Ridker, P. M. *et al.* Inflammation and cholesterol as predictors of cardiovascular events among patients receiving statin therapy: a collaborative analysis of three randomised trials. *The Lancet* (2023) doi:10.1016/S0140-6736(23)00215-5.