

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

**Implication des PPARgamma dans l'effet cardioprotecteur des  
endocannabinoïdes et du préconditionnement ischémique**

Par  
**DIMA AWAD**

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de maîtrise  
En sciences pharmaceutiques  
Option pharmacologie

Mars 2005

© Dima Awad, 2005

QV  
705  
U58  
2005  
V.012

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:  
Implication des PPARgamma dans l'effet cardioprotecteur des  
endocannabinoïdes et du préconditionnement ischémique

Présenté par :

**Dima Awad**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Céline Fiset**, président rapporteur

**Daniel Lamontagne**, directeur de recherche

**Albet Adam**, membre du jury



## Résumé

### En français

Le Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) est un facteur de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il s'active suite à la liaison d'un ligand et il semble être impliqué dans des phénomènes de cardioprotection. Dans le laboratoire de Dr Lamontagne, on s'intéresse surtout à l'étude des mécanismes d'action des endocannabinoïdes et du préconditionnement ischémique (PCI). Nous avons tenté de découvrir une implication des PPARs dans les phénomènes de cardioprotection observés suite à la perfusion d'endocannabinoïdes ou suite à un PCI. Le CD36 étant un récepteur « éboueur » dont l'expression est augmentée suite à l'activation des PPARgamma, nous avons également voulu tester une interaction PPARgamma/CD36 dans la cardioprotection post-ischémique sur modèle de Langendorff. Nous avons pu observer un effet cardioprotecteur suite à l'injection de Ciglitazone, un agoniste sélectif des PPARgamma. L'utilisation d'un antagoniste sélectif des PPARgamma (GW9662) a pu complètement abolir cet effet. Nous avons pu noter un effet cardioprotecteur des endocannabinoïdes, du WY14643 (agoniste sélectif des PPARalpha) et du PCI suite à une ischémie reperfusion (I/R). La perfusion de GW9662 antérieurement à ces traitements n'a pas pu abolir leur effet cardioprotecteur post-ischémique. Nous avons même pu constater une amélioration de la récupération cardiaque suite à la perfusion d'un traitement double par le GW9662 et les endocannabinoïdes. Des résultats similaires étaient observés avec le PCI. Le fait que le GW9662 puisse agir comme un agoniste partiel des PPARalpha, nous a poussé à réfléchir à une implication plus importante des PPARalpha dans le phénomène de cardioprotection observé avec les endocannabinoïdes et le PCI. D'après nos résultats, le CD36 paraissait être un récepteur jouant un rôle important dans le phénomène de cardioprotection observé suite à l'activation des PPARgamma.

Un travail supplémentaire est nécessaire pour mieux comprendre la liaison directe entre le PPARgamma et le CD36 dans la cardioprotection post-ischémique non seulement en mesurant les lésions suite à une I/R mais aussi en analysant les paramètres hémodynamiques. De plus, l'exposition de souris PPARalpha-/- à une I/R pourra contribuer à mieux comprendre la relation entre les PPARalpha et son effet cardioprotecteur observé avec les endocannabinoïdes et le PCI.

*Mots-clés: PPARgamma, PPARalpha, endocannabinoïdes, PCI, CD36, cardioprotection, 2AG, PEA, WY14643, GW9662, Cig, cœur, rat, souris.*

## Summary

### In English

Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) is a ligand-activated transcription factor belonging to the nuclear receptor superfamily which is implicated in cardioprotection phenomena. In the laboratory of Dr Lamontagne, we are especially interested in investigating the mechanisms afforded by endocannabinoids and ischemic preconditioning (IPC). Our findings lead us to investigate the possible involvement of the PPARs in the phenomena of cardioprotection observed after the perfusion of endocannabinoids or after an IPC. The CD36 being a scavenger receptor of which the expression is increased in response to PPARgamma activation, we wanted to test the link between PPARgamma/CD36 in post-ischemic cardioprotection. We were able to observe a cardioprotective effect in hearts treated with Ciglitazone, a selective agonist of the PPARgamma. GW9662, a selective antagonist of PPARgamma, completely abolished the cardioprotective effect of Ciglitazone. A cardioprotective effect of endocannabinoids, WY14643 (selective agoniste of the PPARalpha) and IPC was noted at the end of I/R protocol. The administration of GW9662 to hearts treated with 2AG, PEA, WY14643 and IPC did not abolish their post-ischemic cardioprotective effect. In fact, we could observe improvement in cardiac ventricular recovery when treatment with endocannabinoids was combined with GW9662. Similar results were observed with the IPC. The ability of GW9662 to act in a PPARgamma-independent manner or as a partial agonist of PPARalpha might explain our results. PPARalpha activation seems to be the most implicated member of the PPARs in cardioprotection observed with endocannabinoids and IPC. In addition, CD36 seems to play an important role in cardioprotection afforded by PPARgamma activation. Additional work is necessary to provide further evidence for the direct causal link between PPARgamma and CD36 in post-

ischemic cardioprotection, not only by measuring I/R injury but also by analyzing hemodynamic parameters. Moreover, exposing PPARalpha-/- mice to the I/R injury may contribute to our understanding of the relationship between PPARalpha and its cardiac protective effect observed with endocannabinoids and IPC.

*Keywords: PPARgamma, PPARalpha, endocannabinoids, PCI, CD36, cardioprotection, 2AG, PEA, WY14643, GW9662, Cig, heart, rat, mice.*

## Table des matières

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>I</b>
<b>EN FRANÇAIS</b> .....	<b>I</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>III</b>
<b>IN ENGLISH</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>DÉDICACES</b> .....	<b>XII</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>2</b>
<b>1-GÉNÉRALITÉS:</b> .....	<b>2</b>
<b>2-PPARGAMMA :</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 -DÉFINITION :</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 –STRUCTURE ET ACTIVITÉS :</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3 –RÉGULATION DE L’ACTIVITÉ DES PPARGAMMA :</b> .....	<b>8</b>
2.3.1-Phosphorylation : .....	<b>8</b>
2.3.2-Ubiquitination : .....	<b>10</b>
<b>2.4-RÔLE DES PPARGAMMA DANS L’INFLAMMATION :</b> .....	<b>14</b>
<b>2.5 –AUTRES RÔLES DES PPARGAMMA :</b> .....	<b>15</b>
<b>2.6-LIGANDS DES PPARGAMMA :</b> .....	<b>16</b>
2.6.1-Ligands naturels : .....	<b>16</b>
2.6.2Ligands synthétiques : .....	<b>17</b>
2.6.3-Agonistes partiels et antagonistes: .....	<b>25</b>
<b>3-PRÉCONDITIONNEMENT ISCHÉMIQUE :</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1-DÉFINITION :</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2-MÉCANISME D’ACTION :</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3-LES CONSÉQUENCES FONCTIONNELLES DU PRÉCONDITIONNEMENT</b> .....	<b>34</b>

3.3.1-La réduction des arythmies ventriculaires : .....	34
3.3.2-L'atténuation de la fonction contractile post-ischémique.....	35
<b>4.CANNABINOÏDES : .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1-DÉFINITION : .....</b>	<b>36</b>
<b>4.2-LES CANNABINOÏDES ET LEURS RÉCEPTEURS .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3-MÉCANISME D'ACTION : .....</b>	<b>38</b>
<b>4.4-LIGANDS ENDOGÈNES : .....</b>	<b>40</b>
<b>4.5-LA SÉCRÉTION, LE TRANSPORT ET LA DÉGRADATION DES</b>	
<b>ENDOCANNABINOÏDES : .....</b>	<b>46</b>
<b>4.6-RELATION STRUCTURE - ACTIVITÉ : .....</b>	<b>48</b>
<b>4.7-EFFETS DES CANNABINOÏDES : .....</b>	<b>50</b>
<b>5-BUTS DU TRAVAIL : .....</b>	<b>52</b>
<b>ARTICLE .....</b>	<b>54</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>56</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>58</b>
<b>MATERIALS AND METHODS: .....</b>	<b>60</b>
<b>HEART PREPARATION:.....</b>	<b>60</b>
<b>EXPERIMENTAL PROTOCOLS: .....</b>	<b>61</b>
<b>INFARCT SIZE DETERMINATION.....</b>	<b>58</b>
<b>DRUGS:.....</b>	<b>63</b>
<b>STATISTICAL ANALYSIS:.....</b>	<b>64</b>
<b>RESULTS.....</b>	<b>68</b>
<b>ROLE OF PPAR GAMMA AND ALPHA ON I/R HEARTS: .....</b>	<b>68</b>
<b>ROLE OF CANNABINOIDS ON I/R HEARTS: .....</b>	<b>70</b>
<b>ROLE OF IPC PLUS PPARGAMMA ANTAGONIST ON I/R HEARTS:.....</b>	<b>72</b>
<b>CD36-/- MICE:.....</b>	<b>73</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>87</b>

<i>CONCLUSION</i> .....	91
<i>REFERENCES</i> .....	92
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION</b> .....	99
<i>DISCUSSION</i> .....	100
<i>CONCLUSIONS</i> .....	111
<i>PERSPECTIVES</i> .....	112
<i>LISTES DE RÉFÉRENCES</i> .....	113

### Liste des sigles et abréviations

2-AG : 2-arachidonyl glycérol

9-HODE : acide 9-Hydroxyoctadéca-9Z, 11E- diénoïque

13-HODE : acide 13 Hydroxyoctadéca-9Z, 11E-diénoïque

15d-PGJ<sub>2</sub> : 15-déoxy-delta 12,14-prostaglandine J<sub>2</sub>

AA : acides aminés

ADN : acide désoxyribonucléique

AF-1 : fonction d'activation 1

AF-2 : fonction d'activation 2

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien

AP-1 : protéine activatrice 1

AP-2 : protéine activatrice 2

AT-1 : récepteur à l'angiotensine 1

AMPc : adénosine 3', 5' monophosphate cyclique

ANOVA : analyse de variance

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

Ca<sup>2+</sup> : calcium

CaCl<sub>2</sub> : chlorure de calcium

CAP : protéine associée au c-Cbl

CBP : élément de réponse de l'AMPc

Cig : ciglitazone

CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone

COX : cyclo-oxygénase

DAG: diacylglycérol

DMSO: diméthylsulfoxyde

DRIP: protéine intégratrice du récepteur de la Vitamine D (*Vit. D receptor integrating protein*)

EDHF: facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (*endothelium derived hyperpolarizing factor*)

EDTA: acide éthylènediaminetétraacétique

EGF: facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor*)

ERK: kinase extracellulaire régulée par un signal (*extracellular signal regulated kinase*)

ET-1: endothéline 1

FAAH: hydrolase de l'amide de l'acide gras (*fatty acid amide hydrolase*)

FAE: acide gras éthanolamide (*fatty acid ethanolamine*)

FAK: kinase de l'acide gras (*fatty acid kinase*)

GLUT-4: transporteur de glucose sensible à l'insuline (*insuline sensitive glucose transporter*)

GMPc: guanosine 3', 5' monophosphate cyclique

HR: fréquence cardiaque (*heart rate*)

Hsp: protéine de choc thermique (*heat shock protein*)

IDM: infarctus du myocarde

$I_{K_{ATP}}$ : courant induit par les canaux  $K_{ATP}$  (*induced  $K_{ATP}$  channel current*)

IL: interleukine

iNOS: NO synthétase inductible

JNK: kinase du  $NH_2$  terminal de c-jun (*c-jun  $NH_2$ -terminal kinase*)

ISGF-RE: élément de réponse du facteur génique stimulé par l'interféron (*interferon stimulated gene factor response element*)

$K_{ATP}$ : canal potassique dépendant de l'ATP

$K_{Ca}$ : canal potassique dépendant du calcium

$KH_2PO_4$ : phosphate de potassium

LDB: domaine de liaison au ligand (*ligand binding domain*)

LDL: lipoprotéine de faible densité (*low density lipoprotein*)

LPS: lipopolysaccharides bactériens

LTD<sub>4</sub>: leucotriène D<sub>4</sub>

LVDP: pression développée du ventricule gauche (*left ventricular developed pressure*)

MAPK: protéine kinase activée par un mitogène (*mitogen activated protein kinase*)

MAPKK: protéine kinase kinase activée par un mitogène (*mitogen activated protein kinase kinase*)

MGL: monoglycéride lipase

MgSO<sub>4</sub>: sulfate de magnésium

MPTP: pore de transitions de perméabilité mitochondrial (*mitochondrial permeability transitions pore*)

NaCl: chlorure de sodium

NaHCO<sub>3</sub>: bicarbonate de sodium

NFAT: facteur nucléaire des cellules T activées (*nuclear factor of activated T-cells*)

NF- $\kappa$ B: facteur nucléaire  $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*)

NMDA: N-méthyl-D-aspartate

NO: monoxyde d'azote

NOS: synthétase du monoxyde d'azote

O<sub>2</sub>: oxygène

OH: radical hydroxyl

OEA: oléoyléthanolamide

P300: integrator protein

PBP: PPAR binding protein

PCI: préconditionnement ischémique

PDGF: facteur de croissance dérivé des plaquettes (*platelet derived growth factor*)

PEA: palmitoyléthanolamide

PEPCK: carboxykinase du phosphoénol pyruvate (*phosphoenol pyruvate carboxykinase*)

PGD<sub>2</sub>: prostaglandine D<sub>2</sub>

PGE<sub>2</sub>: prostaglandine E<sub>2</sub>

PGI<sub>2</sub>: prostaglandine I<sub>2</sub> ou prostacycline

PKA: protéine kinase A (dépendante de l'AMP cyclique)

PKB : protéine kinase B

PKC: protéine kinase C (dépendante du calcium)

PKG: protéine kinase G (dépendante du GMP cyclique)

PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>

PLC: phospholipase C

PPAR: *peroxisome proliferator activated receptor*

PPRE: élément de réponse aux PPAR (*PPAR response element*)

RXR: récepteur rétinoïde X

SRC-1: coactivateur au récepteur stéroïde-1 (*steroid receptor coactivator-1*)

STAT: transducteur de signal et activateur de transcription (*signal transducer and activator of transcription*)

TBS: tampon phosphate

THC: tétrahydrocannabinol

TNF: facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor*)

TRAIL: ligand induisant une apoptose reliée au TNF (*TNF-related apoptosis inducing ligand*)

TRAP: protéine associée au récepteur à l'hormone thyroïdienne (*thyroid hormone receptor associated protein*)

TRE: élément de réponse au TNF (*TNF response element*)

TZDs: thiazolidinediones

*Dédicaces*

*A mon plus grand amour, à mon père **Khattab***

*A ma plus grande tendresse, à ma mère **Nassima***

*A ma plus grande fierté, à mon frère **Zaher***

*A ma plus grande amitié, à ma sœur **Rola***

*A la personne qui me manque le plus, à ma grandmère **Rahma***

*A ma douce moitié, à mon amour **Ghassan***

## Remerciements

*Je tiens à remercier mon directeur de recherche **Dr Daniel Lamontagne** « the boss » pour ses qualités morales et scientifiques. Je voudrais le remercier de m'avoir aidé à accomplir une étape importante de ma vie. Il a été toujours là pour m'écouter et me motiver pendant mes coups de « blues ».*

*Je tiens à remercier les membres du jury : **Dr Celine Fiset** et **Dr Albert Adam** pour leurs commentaires scientifiques précieux.*

*Je tiens à remercier mes collègues de laboratoire, **Christine Hamel**, **Philippe Lépicier** et **Christian Jossart** pour leur support aussi bien scientifique que moral.*

*Je tiens à remercier **Dr Rana Temsah** pour son aide précieuse, pour son amitié, pour ses conseils aussi bien sur le plan professionnel que personnel.*

*Je remercie **Dr Huy Ong** pour ses conseils et son support scientifique.*

*Je remercie ma collègue et mon amie **Diala Harb** pour son grand cœur et surtout son humour.*

*Je remercie mon collègue et mon ami **Raymond Hreiche** pour son aide et son support.*

*Je remercie ma collègue et mon amie **Marie Lordkipanidzé** pour simplement tout.*

*Je remercie **Eve-Marie Charbonneau** pour son efficacité et sa patience.*

*Je remercie toute l'administration de la faculté de Pharmacie pour leur efficacité, leur sympathie et leur sourire toujours présent.*

# **Chapitre I:**

## Introduction

## *1-Généralités:*

Les maladies cardiovasculaires sont la cause majeure de décès dans la population nord-américaine (143).

Les taux de survie ont été améliorés par des techniques variables de revascularisation :

- Lyse pharmacologique des callots intra-coronaires
- Stent mécanique
- Chirurgie de pontage coronarien

Malheureusement une perte de la masse tissulaire musculaire cardiaque n'a pas pu être évitée (143). Les besoins en oxygène du myocarde sont directement déterminés par l'activité contractile au niveau ventriculaire et sont fixés par 3 facteurs : la fréquence cardiaque, l'inotropie et la tension pariétale myocardique (tension au niveau de la paroi artérielle). L'insuffisance coronaire apparaît en cas d'inadéquation entre les besoins en oxygène du myocarde et les apports par la circulation coronaire (95). L'infarctus du myocarde (IDM) survient quand le myocarde est sujet à une carence prolongée en oxygène conduisant à une nécrose cellulaire irréversible. Cette carence s'observe le plus souvent suite à la constitution d'un thrombus au niveau de l'artère coronaire après une rupture d'une plaque d'athérome.

Dans un petit nombre de cas, un IDM peut être déclenché par un vasospasme dont la cause peut être variée (effort physique excessif, exposition violente au froid intense, cocaïne ...etc) (77). Une diète riche en matières grasses et une sédentarité constituent des facteurs environnementaux qui affectent directement plusieurs aspects de la santé humaine de la société nord-américaine (112, 172). Le diabète, l'obésité et les maladies cardiovasculaires sont les causes majeures de mortalité dans cette société (125). Il a été établi qu'une restriction calorique avec une diète pauvre en matières grasses augmente la longévité et diminue l'incidence de la survenue des désordres métaboliques et cardiovasculaires (9).

Il faut préciser les diètes riches en acides gras ne sont pas toutes mauvaises ; les diètes riches en acides gras monoinsaturés (diète méditerranéenne) et les diètes riches en acides gras polyinsaturés (diète des invits) semblent avoir des effets cardioprotecteurs (106, 250).

L'épidémiologie des maladies métaboliques humaines et les études sur les régimes alimentaires chez les animaux supportent le fait qu'un régime riche en calories joue un rôle important dans la régulation du métabolisme lipidique, la sensibilité à l'insuline, l'homéostasie du glucose et l'athérosclérose (172, 173). Ce n'est donc pas surprenant que tous les mammifères soient munis de systèmes hormonaux qui sont responsables de la régulation du métabolisme des acides gras (137).

Une famille de facteurs de transcription connue sous le nom de « Peroxisome Proliferator-Activated Receptors » (**PPARs**) joue un rôle primordial dans la régulation du stockage et du catabolisme des acides gras, dans l'homéostasie du glucose, dans la différenciation cellulaire ainsi qu'un rôle important dans l'inflammation (23). Jusqu'à présent, trois isotypes de PPARs ont été identifiés : PPARalpha (NR1C1), PPARbêta (NR1C2) ou delta et PPARgamma (NR1C3). Ces isotypes sont les produits de gènes différents (293). Notre recherche s'intéresse uniquement au PPARgamma.

## ***2-PPARgamma :***

### ***2.1 -Définition :***

Les PPARs sont des membres prototypes de la superfamille des récepteurs nucléaires (154, 268, 301). Ils règlent l'expression de certains gènes en réponse à leur liaison à un agoniste (299). Il existe 2 isoformes des PPARgamma : PPARgamma 1 qui sont largement distribués au niveau des tissus surtout au niveau cardiaque, intestinal et musculaire ; PPARgamma 2 qui sont surtout exprimés au niveau du tissu adipeux (268). Ces isoformes sont produits par l'expression d'un même gène, ils diffèrent uniquement par l'addition de 30 acides aminés (AA) (pour l'homme) au niveau N-terminal des PPARgamma 2 (45, 273). L'expression de chaque isoforme est conduite par un promoteur spécifique d'où la grande diversité de leurs ligands et de leurs réponses tissulaires spécifiques (154). Le gène des PPARgamma a été identifié par un essai d'hybridation in situ utilisant la biotine marquée. Les résultats ont montré qu'un gène des PPARgamma code pour plus d'un produit protéinique (154). La spécificité des gènes cibles n'est pas uniquement déterminée par la nature de l'élément de réponse au niveau du promoteur mais également par le type du coactivateur recruté. Ce dernier est à son tour affecté par la nature du ligand lié (154).

Les PPARgamma sont les sous types les plus étudiés. Ces récepteurs ont été clonés pour différentes espèces comme le saumon, la souris, le hamster, la grenouille, le cochon, le singe et l'humain (268). L'expression des PPARgamma ne se limite pas au tissu adipeux. Les PPARgamma règlent l'homéostasie des lipides et du glucose, ils sont également impliqués dans la biologie des monocytes, dans la régulation du cycle cellulaire et du développement tumoral. La protéine des PPARgamma montre une remarquable

conservation entre les différentes espèces, contrairement aux PPARalpha et bêta (268).

## 2.2 –Structure et activités :

Les protéines des PPARgamma sont composées de cinq domaines différents : une région N-terminal (domaine A/B), un domaine C qui lie l'ADN (DNA binding domain (DBD)), un domaine D (hinge region), un domaine E qui lie les ligands (ligand binding domain (LBD)) et un domaine F. Le domaine A/B contient la fonction d'activation 1 (AF-1), ce domaine opère en absence de ligand. Le DBD est composé de 2 doigts de zinc (zinc fingers) et contient 9 cystéines qui sont conservées chez toute la superfamille des récepteurs nucléaires. Ce domaine confère aux PPARs leur spécificité de liaison à l'ADN (23).

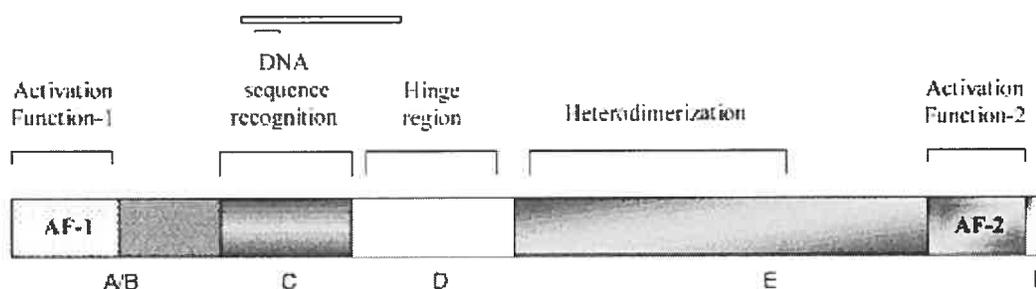


Figure 1.Représentation schématique des PPARs (Blanquart C et al 2003)

Dans la transactivation (activation des éléments de réponse « cis » d'un promoteur par des facteurs de transcription « trans » ou transrégulateurs) qui est dépendante de l'ADN, les PPARgamma subissent des changements conformationnels. Il y a ainsi recrutement de cofacteurs et de coactivateurs. Les

coactivateurs interagissent avec les récepteurs nucléaires par une voie dépendante du ligand. Les PPARgamma forment des hétérodimères avec les récepteurs rétinoïdes X (RXR), ces hétérodimères reconnaissent des éléments de réponses ADN spécifiques appelés **PPAR response elements (PPRE)**. Les PPRE se trouvent au niveau du promoteur des gènes cibles, d'où la transcription de ces gènes (154, 268, 119). L'activation de l'hétérodimère PPAR/RXR peut interagir avec la HSP-72, le LXR, la PBP, le SRC-1, la P300, le complexe TRAP/DRIP, la CBP...etc, d'où la modulation de la transcription de certains gènes (301).

Dans la transrépression (répression des éléments de réponse « cis » d'un promoteur par des facteurs de transcription « trans » ou transrégulateurs) qui est indépendante de l'ADN, les PPARgamma peuvent réprimer la transcription de certains gènes en interférant négativement avec d'autres voies de signalisation, par exemple la voie de signalisation de NF-kB, de TRE, de ISGF-RE (268).

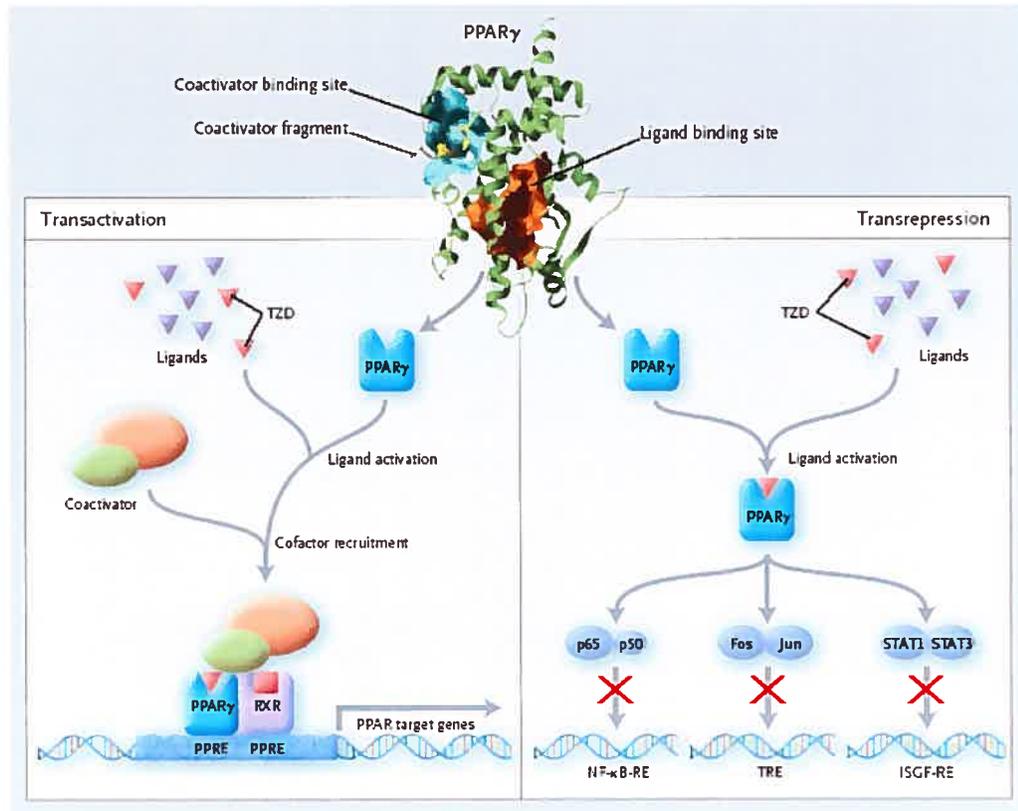


Figure 2. Mécanismes moléculaires des réponses biologiques des thiazolidinediones (TZDs) (Yki-Jarvinen H. 2004). Dans la transactivation, il y a formation d'un hétérodimère de PPAR $\gamma$  et de RXR. Ce dimère reconnaît des éléments de réponse (PPRE) au niveau du promoteur des gènes cibles. Ceci résulte en une transcription des gènes cibles des PPAR $\gamma$ . Après une liaison d'un ligand, les PPARs subissent des transformations conformationnelles et recrutent les cofacteurs et les coactivateurs. Les coactivateurs interagissent avec les récepteurs nucléaires par une voie indépendante du ligand. Dans la transrépression, les PPARs peuvent réprimer la transcription des gènes en interférant négativement avec les autres voies de transduction et ceci d'une façon indépendante de la liaison des PPARs à l'ADN nucléaire.

### ***2.3 –Régulation de l'activité des PPARgamma :***

#### *Les modifications après la traduction:*

Il a été démontré que les activités traductionnelles des PPARgamma sont régulées par des mécanismes post-traductionnels dont la phosphorylation et l'ubiquitination :

#### **2.3.1-Phosphorylation :**

Les changements environnementaux et des signaux extracellulaires modifient le statut de phosphorylation des protéines cellulaires. L'état de phosphorylation des récepteurs nucléaires joue un rôle majeur dans leur activité transcriptionnelle.

Les PPARgamma sont des phosphoprotéines (démonstré par Zhang en 1996 (306)). Dans l'étude faite par Blanquart et al (23), il a été démontré que le traitement par l'insuline augmente l'activité transcriptionnelle ligand-indépendante des PPARgamma (activité basale) et exerce une action synergique avec les ligands des PPARgamma pour augmenter son activité transcriptionnelle. En plus les auteurs ont démontré que les PPARgamma sont phosphorylés par la voie de signalisation des MAPK in vivo. En revanche, il a été démontré que la phosphorylation des PPARgamma des souris par des activateurs des MAPK (exp : Growth Factors) (136), induit une inhibition de leur activité transcriptionnelle. Cet effet survient via la phosphorylation de la sérine 112 des PPARgamma-2. Ce résultat a été confirmé par une étude réalisée par Adam et coll. dans laquelle ils avaient montré que la sérine 84 des PPARgamma 1 chez l'homme est phosphorylée par les MAPK ERK2 et JNK (3). Une mutation de cette sérine augmente l'activité transcriptionnelle de AF-1 des PPARgamma. Camp et coll. ont pu également démontrer que les

PPARgamma-1 chez les souris sont régulés par phosphorylation de la sérine 82 par les MAPK (41). De plus, ces auteurs ont démontré que JNK, une MAPK, phosphoryle également PPARgamma-2 et diminue son activité transcriptionnelle dépendante du ligand. L'effet de la phosphorylation de la sérine 112 par les MAPK, sur l'activité transcriptionnelle des PPARgamma ligand-dépendante peut s'expliquer par une modification de l'interdomaine de communication qui diminue son affinité de liaison au ligand (246). Une étude effectuée sur des lignées d'adipocytes a démontré que la croissance de la cellule ainsi que la différenciation des adipocytes sont dépendantes du statut de phosphorylation des PPARgamma ce dernier étant régulé par différents facteurs de croissance (exp. EGF, PDGF) (244). Dans les macrophages, une voie de signalisation similaire régule le fonctionnement des PPARgamma (109). Han et coll. ont démontré que le traitement des macrophages par le TGF bêta 1 et le TGF bêta 2 peut inhiber l'expression de CD36 qui est normalement induit par la liaison des PPARgamma à son ligand. Cette inhibition est le résultat de l'activation de la voie de signalisation des MAPK (163). L'activité transcriptionnelle basale ou induite des PPARgamma est stimulée par l'activation de la PKA, de même que pour les PPARalpha (163). Néanmoins, la phosphorylation par les MAPK influence différemment les PPARgamma et les PPARalpha : la phosphorylation des PPARgamma par les MAPK les inhibe, tandis que la phosphorylation des PPARalpha par les MAPK les active (23).

En bref, toutes les études ont clairement démontré que les PPARgamma sont régulés par des kinases activées par de nombreux signaux extracellulaires. Pour cela, l'activation des PPARgamma est sujette à de vastes modulations dues aux changements physiologiques.

### 2.3.2-Ubiquitination :

Plusieurs résultats ont pu démontrer que le système de dégradation ubiquitine-protéasome affecte l'activité de plusieurs récepteurs nucléaires. Cette voie de dégradation est impliquée dans la régulation de beaucoup de protéines impliquées essentiellement dans les fonctions cellulaires, le contrôle du cycle cellulaire, la régulation de la transcription et le signal de transduction (191). Les protéines dégradées par cette voie sont modifiées en se liant par une liaison covalente des lysines à un polypeptide de 8 kDa, appelé ubiquitine. Ce processus comprend trois étapes :

1. activation de l'ubiquitine par une enzyme (ubiquitine-activating ubiquitine)
2. transfert de l'ubiquitine activée sur une protéine porteuse
3. catalyse de la liaison covalente de *l'ubiquitine - protéine porteuse* par une ubiquitine-protéine ligase et liaison de l'ubiquitine à la protéine cible.

Par conséquence, une multitude de protéines « ubiquitinées » sont rapidement dégradées par le 26S protéasome (123). L'activation des PPARgamma par un ligand conduit à leur dégradation par cette voie (116). Le repositionnement de l'hélice AF-2 des PPARgamma est essentiel pour son ubiquitination, donc pour sa dégradation. L'interaction des PPARgamma avec des corépresseurs les protège de la dégradation et leur interaction avec des coactivateurs conduit à leur dégradation via la voie de l'ubiquitination (116). Les PPARalpha sont également dégradés par cette voie et leur dégradation régule directement leur activité transcriptionnelle (22). Ces observations suggèrent que les activités des PPARgamma et des PPARalpha sont régulées différemment par la voie de protéasome. Néanmoins, il est à noter que la dégradation des PPARalpha a été étudiée cinq heures après leur liaison à un ligand, tandis que la dégradation des PPARgamma a été étudiée 15-20 heures après leur liaison à un ligand. Il est donc possible que la régulation de la

dégradation des PPARs par leurs ligands diffère en fonction du temps (23). Dans un premier temps, le ligand peut protéger les PPARs de la dégradation pour augmenter ainsi son effet, dans un deuxième temps, le repositionnement de AF-2 et le recrutement d'un cofacteur peuvent aboutir à l'ubiquitination des PPARs et leur dégradation, mécanisme qui arrête l'activité transcriptionnelle des PPARs. Les signaux extracellulaires qui activent les voies intracellulaires de phosphorylation peuvent aussi influencer le processus de dégradation (82).

En conclusion, la voie ubiquitine-protéasome constitue un mécanisme important dans la régulation de la dégradation des PPARs et de leur activité transcriptionnelle en contrôlant les taux cellulaires en protéines PPARs.

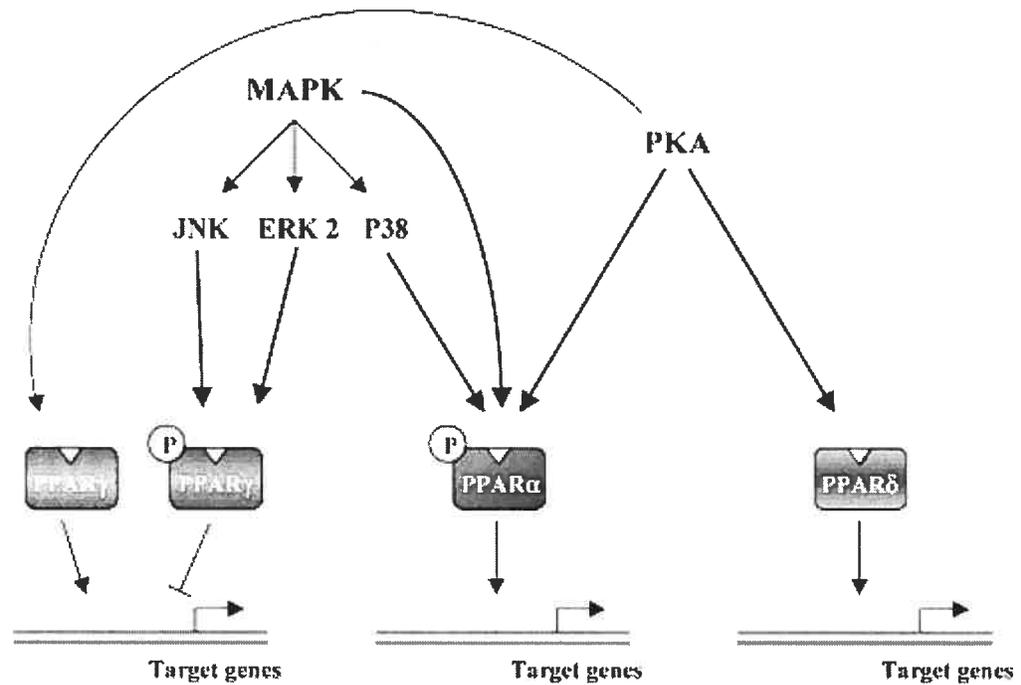


Figure 3. Représentation des voies de signalisation des kinases impliquées dans la phosphorylation et la régulation de l'activité transcriptionnelle des PPARs (Blanquart C et al. 2003)

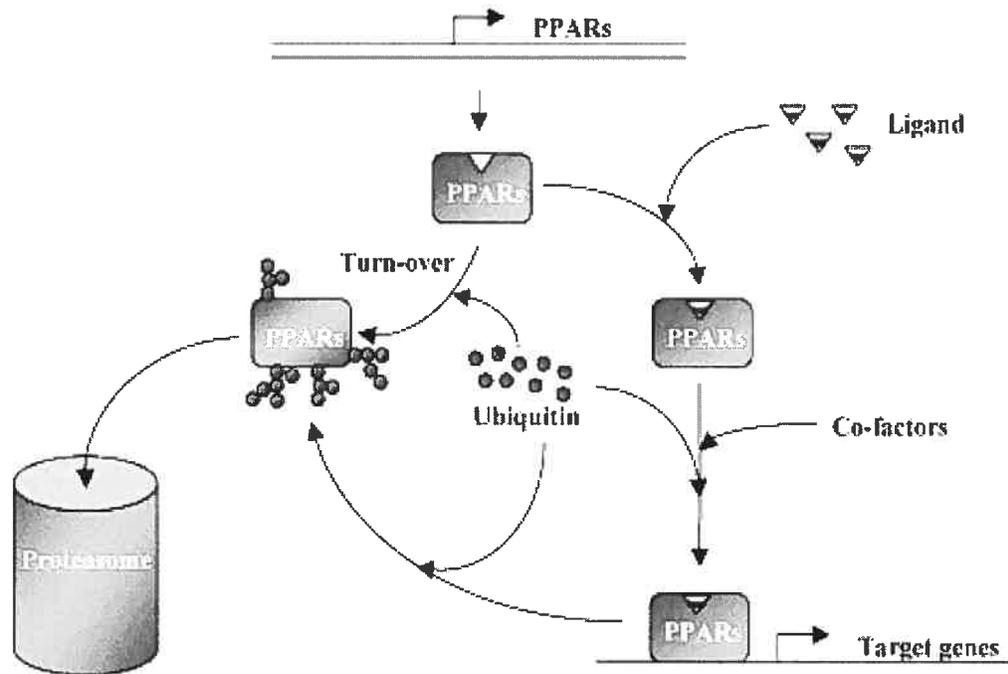


Figure 4. Les mécanismes de dégradation possible des PPARs par le système ubiquitine-protéasome (Blanquart C et al 2003). Les protéines des PPARs sont dégradées par la voie de l'ubiquitine-protéasome. Ce système contrôle les taux de ces protéines dans les cellules et l'intensité de la réponse suite à la liaison d'un ligand. Dans un premier temps, le ligand stabilise les protéines des PPARs en diminuant son ubiquitination, dans un second temps, le ligand induit une dégradation de ces protéines suite au recrutement des cofacteurs et ceci a pour but d'arrêter la réponse engendrée.

#### ***2.4-Rôle des PPARgamma dans l'inflammation :***

Le rôle des PPARgamma dans l'inflammation est controversé. D'une part, il a été démontré que les glitazones, agents antidiabétiques qui augmentent la sensibilité à l'insuline des tissus cibles dans le diabète type II, diminuaient l'inflammation du colon chez un modèle de souris présentant la maladie, ils inhibaient en fait la production de TNF alpha et de gélatinase B chez des souris déficientes en récepteurs LDL (170). Par contraste, Thieringer et coll. ont démontré que les glitazones n'affectaient pas l'induction de l'expression d'IL6 et de TNF alpha dépendante des lipopolysaccharides (LPS), ils n'affectaient pas non plus la sécrétion de certaines cytokines au niveau des monocytes et des macrophages (270). Des études moléculaires in vitro ont montré que les PPARgamma peuvent interférer dans certaines voies inflammatoires. Ils peuvent, par exemple, interférer physiquement avec les P50 et les P65 inhibant ainsi NF-kB (47). Les glitazones inhibent l'expression de c-fos au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires, cela constitue un mécanisme additionnel de répression de la voie AP-1 par les PPARgamma (161). Les PPARgamma inhibent également l'expression de iNOS en interférant avec les voies de signalisation de STAT-1, de AP-1 et de NF-kB (176). Au niveau des lymphocytes T, les ligands des PPARgamma entraînent une diminution de la sécrétion de IL-2 due à leur interaction avec le NFAT (297).

En conclusion, on peut dire que les PPARgamma peuvent interférer dans différentes étapes de la réponse inflammatoire. En effet, ils modulent l'expression des chimiokines, des récepteurs aux chimiokines, et des molécules d'adhésion au niveau des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses, des monocytes/macrophages et des cellules T (74).

### *2.5 –Autres rôles des PPARgamma :*

Les PPARgamma occupent un rôle central dans le métabolisme corporel. Ils sont responsables de la différenciation des préadipocytes en adipocytes (154, 301)

Les PPARgamma augmentent l'expression des gènes qui ont pour rôle de promouvoir le stockage des acides gras. Ils répriment les gènes qui induisent la lipolyse dans les adipocytes (5). Ils augmentent l'expression des gènes codant pour les protéines de transport des acides gras, l'enzyme malique et la carboxykinase du phosphoénol pyruvate (PEPCK) (268). Les PPARgamma augmentent ainsi la masse du tissu adipeux. Or plusieurs adipokines qui affectent la voie de signalisation de l'insuline sont sécrétées par la masse adipeuse par exemple : le TNFalpha (124), la leptine (52, 238), la résistine (257) et l'adiponectine (86, 184). L'adiponectine augmente la sensibilité à l'insuline au niveau du tissu adipeux et possède des propriétés antiathérogéniques (301). Les taux d'adiponectine sont bas chez les patients obèses et/ou présentant un diabète de type II ainsi que chez les patients lipodystrophiques (301).

Les PPARgamma jouent un rôle primordial dans l'homéostasie du glucose. Ils activent les gènes codant pour la GLUT4 et pour certaines molécules de signalisation comme la c-Cbl et de sa protéine associée, la CAP (268).

Les PPARgamma semblent également jouer un rôle important in vivo et in vitro dans l'apoptose et la prolifération cellulaire. Citons l'exemple de TRAIL qui est une cytokine membre de la famille TNF. TRAIL tue préférentiellement les cellules tumorales. Les ligands des PPARgamma sensibilisent les cellules tumorales mais pas les cellules normales à l'action apoptotique de TRAIL, ce qui suggère le rôle pro-apoptotique et anti-prolifératif des PPARgamma au niveau des tumeurs (268). Cet effet anti-cancéreux a été testé dans plusieurs études sur différents types de cancer (poumons (278), foie (276), colon (298), sein (48, 49, 77), cerveau (145), pancréas (134)).

## ***2.6-Ligands des PPARgamma :***

### **2.6.1-Ligands naturels :**

La recherche des ligands naturels des PPARgamma a conduit à la découverte de nombreux acides gras et des dérivés eicosanoïdes qui lient et activent ces récepteurs à des concentrations micromolaires (293). Les PPARgamma ont une préférence pour les acides gras polyinsaturés (296). Les acides gras essentiels (acide linoléique), l'acide linoléique, l'acide arachidonique et l'acide eicosa-pentaénoïque (voir figure 5) ont montré leur capacité de se lier aux PPARgamma à des concentrations micromolaires (152, 296). Ces concentrations d'acides gras sont normalement retrouvées dans le sérum humain (142) mais pas nécessairement au niveau intracellulaire. En effet, les acides gras ne sont pas particulièrement des activateurs efficaces des PPARgamma. Il a été démontré que la conversion intracellulaire des acides gras en eicosanoïdes suite à l'augmentation de l'expression de la 15-lipoxygénase, résultait en une augmentation de la transactivation des PPARgamma (127). La 15-lipoxygénase métabolite de l'acide linoléique, le 9-HODE (acide 9-Hydroxyoctadéca-9Z, 11E- diénoïque) et le 13-HODE (acide 13-Hydroxyoctadéca-9Z, 11E- diénoïque) (voir figure 5) sont des agonistes des PPARgamma à des concentrations micromolaires (199). Pour cela, la conversion métabolique intracellulaire des acides gras polyinsaturés peut constituer une sorte de régulation hormonale additionnelle des PPARgamma. Les séries « J » des prostaglandines dérivées des PGD<sub>2</sub> ont également été identifiées comme des ligands naturels des PPARgamma. Le métabolite terminal 15-déoxy-delta12,14-prostaglandine J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) (voir figure 5) active les PPARgamma à des concentrations micromolaires, il induit également la différenciation des adipocytes (82, 151). Certains effets intracellulaires de

cette prostaglandine sont médiés par des voies de signalisation cellulaires indépendantes des PPARs (202, 241). Il faut donc être prudent de ne pas attribuer tous les effets biologiques du 15d-PGJ<sub>2</sub> uniquement à l'activation des PPARgamma. L'acide 15-hydroxy-eicosatétraoïque, un métabolite de l'acide arachidonique, constitue également un ligand naturel des PPARgamma (268, 301).

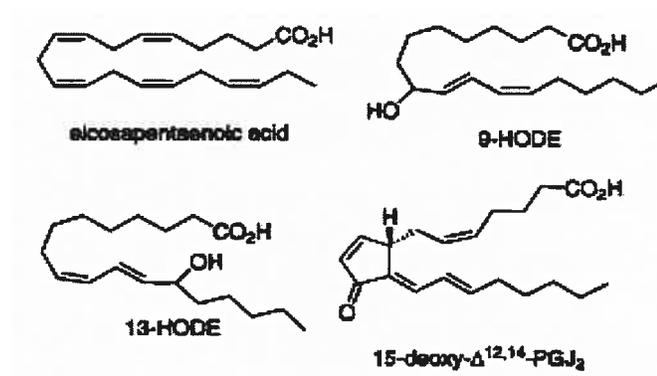


Figure 5. Structures de quelques ligands naturels des PPARgamma

### 2.6.2-ligands synthétiques :

Les ligands pharmacologiques des PPARgamma sont une classe d'hypoglycémiant oraux, les thiazolidinediones (TZDs) et une variété des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (97, 223, 279). Les thiazolidinediones appelés aussi « glitazones » sont des agents anti-diabétiques qui augmentent la sensibilité à l'insuline des tissus cibles dans le diabète type II. Les TZDs induisent la différenciation adipocytaire (301). Les glitazones ont été largement étudiées sur des modèles animaux résistants à l'insuline, ce qui a permis leur développement (130). Dans les études cliniques, les TZDs diminuaient les concentrations de glucose postprandial et de jeûne, ainsi que la concentration

des acides gras libres (6, 205). Les concentrations de l'insuline étaient également augmentées dans la plupart de ces études (6, 205).

Ces résultats montrent que les TZDs augmentent la sensibilité des cellules à l'insuline, ceci a été confirmé par des mesures directes in vivo chez les humains (301). Par exemple, le traitement des sujets diabétiques et des sujets non diabétiques pour 3-6 mois par le troglitazone, la rosiglitazone ou la pioglitazone (voir figure 6A), augmente la capture du glucose stimulée par l'insuline au niveau des tissus périphériques (192, 194, 205, 265). Dans des études similaires, les TZDs augmentaient la sensibilité hépatique à l'insuline (la capacité de l'insuline d'empêcher la production endogène de glucose) et la sensibilité des tissus adipeux à l'insuline (l'efficacité de l'insuline de diminuer les concentrations en acides gras) (192). Suite à un traitement par TZD, la sécrétion d'insuline était améliorée chez les sujets présentant une intolérance au glucose ou un diabète de type II (195). Paradoxalement, ces améliorations sont accompagnées par une augmentation du poids et de la masse adipeuse sous-cutanée (2, 43, 192, 193, 194). Le mécanisme d'action moléculaire des TZDs est demeuré obscur jusqu'aux années 90s où un lien probable entre les PPARs et les glitazones a été proposé (132). En effet, il a été démontré que les TZDs induisaient l'expression de certains gènes au niveau des adipocytes. Ils avaient également un effet sur la différenciation des adipocytes dans les cultures cellulaires (132). Les TZDs augmentaient le nombre des petites cellules adipocytaires (194, 217, 208). Plusieurs études ont été faites chez les souris, ces études consistaient à supprimer l'expression des PPARgamma au niveau du tissu adipeux ou au niveau musculaire et de tester la résistance à l'insuline dans les 2 cas (121, 122). Les chercheurs ont remarqué que dans le cas où ils supprimaient l'expression des PPARgamma au niveau du tissu adipeux, ceci n'avait pas d'effet de résistance musculaire à l'insuline (121, 122). En revanche, quand ils supprimaient l'expression musculaire des PPARgamma, ceci produisait une résistance à l'insuline (121, 122). La résistance musculaire à l'insuline ne répondait pas aux traitements par TZDs, ce qui nous laisse croire

que ces agents produisaient leurs effets par stimulation directe des PPARgamma (121). La résistance hépatique à l'insuline chez des souris n'exprimant pas les PPARgamma au niveau de leur tissu adipeux, a pu être renversé par un traitement aux TZDs (122). Ces résultats suggèrent que les effets sensibilisants des TZDs au niveau musculaire et hépatique ne sont pas médiés par les PPARgamma du tissu adipeux et ceci dans le cas où ce tissu adipeux n'est pas capable de répondre normalement à ces agents (122). Par contre, la lipoatrophie qui accompagne la suppression « tissu-spécifique » des PPARgamma peut affecter l'action des TZDs et ceci dépend de l'expression des PPARgamma dans les autres tissus (92). Par exemple, la rosiglitazone peut renverser l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie et l'hyperlipidémie chez les souris normales, tandis qu'elle est inefficace chez les souris lipoatrophiques (92). Des résultats observés sur des modèles de souris transgéniques n'exprimant pas les PPARgamma supportent l'hypothèse que le tissu adipeux est le site d'action le plus important des TZDs si ces souris présentent des quantités normales en tissu adipeux (92). Ils ont pu également démontrer que la pioglitazone augmentait l'expression du gène aP2 (113) en affectant la région de son promoteur, cette région a été identifiée par l'équipe de Spiegelman comme étant un site de liaison aux PPARs (273). Par des essais de liaison et de transactivation, ils ont pu identifier une grande affinité de la rosiglitazone (BRL 49653) aux PPARs gamma. La rosiglitazone est maintenant considérée comme étant un agoniste sélectif des PPARgamma (84, 169). Le degré d'affinité des PPARgamma aux TZDs était compatible et proportionnel aux effets des glitazones sur la diminution de la concentration en glucose (15, 294). Ces résultats montrent que les effets anti-diabétiques des TZDs sont médiés d'une façon majeure par les PPARgamma.

Les TZDs sont en général des agonistes sélectifs des PPARgamma mais peuvent activer les PPARalpha ou delta à des concentrations plus élevées (169, 294). Toutefois, il a été démontré que le KRP-297 (voir figure 6B) qui appartient à la famille des TZDs était un agoniste double des PPARgamma et

des PPARalpha (133, 197). Il a été également rapporté que l'isoxazolidinedione JTT-501 (voir figure 6B) activait les PPARalpha à des concentrations seulement dix fois plus élevées que celles activant les PPARgamma (247). L'activité du JTT-501 est médiée par son métabolite, un amide malonique, qui est généré par hydrolyse de l'anneau hétérocyclique (249). Il a été rapporté que le TZD MCC-555 (voir figure 6B) avait une basse affinité pour les PPARgamma mais une très grande efficacité antidiabétique (218, 282). En effet, MCC-555 agit comme agoniste partiel ou complet des PPARgamma dépendamment du type de la cellule et des éléments de réponse utilisés dans l'essai de transactivation (228). Des séries de TZDs delta 5-insaturés ont montré une basse affinité ou une affinité nulle vis-à-vis des PPARgamma (179, 226). Ces observations nous montrent que les effets antidiabétiques de certains TZDs sont médiés par des mécanismes autres que les PPARgamma. Une explication alternative est aussi probable, ces TZDs sont capables de moduler au niveau d'un tissu spécifique un promoteur des gènes cibles des PPARgamma mais cette modulation peut ne pas être détectable par les essais de transactivation standards des PPARgamma. Cette hypothèse peut ouvrir d'autres horizons pour développer les ligands des PPARgamma (293).

Les TZDs contiennent un centre stéréogénique sur le carbone 5 du groupe hétérocyclique. Ils peuvent subir des racémisations sous certaines conditions physiques (254). En utilisant des essais de liaisons aux PPARgamma, il a été démontré que seulement les (S)-énantiomères des TZDs se lient avec une haute affinité à ces récepteurs (213). Ce résultat suggère que seulement 50% de la substance médicamenteuse des TZDs mise sur le marché et utilisée pour le traitement du diabète type II, est actif. Pour surmonter ce problème, de nombreux groupes de recherche ont travaillé pour développer des groupes acycliques qui ont une moindre tendance à subir une racémisation (293). Le SB 213068 et son (S)-isomère (voir figure 6C) sont représentatifs des séries des acides alpha-alkoxy-béta-phénylpropanoïques (32, 33), ils ont montré une activité agoniste des PPARgamma et des PPARalpha. Les (S)-

énantiomères de ces séries ont montré une plus grande affinité pour les PPARgamma que les (R)-énantiomères, ainsi qu'un plus grand effet sur les adipocytes dans les essais de différenciation (302, 109). De nouvelles séries agonistes des PPARgamma basées sur le groupement tyrosine ont été développés, citons le GI 262570, le GW 7845 (voir figure 6C) (51, 111). Ce sont les premiers antidiabétiques optimisés selon leur affinité pour les PPARgamma humains. Il y a même certains analogues qui ont une activité agoniste des PPARgamma humains à des concentrations d'ordre nanomolaires. Dans les essais de transactivation cellulaires, ces analogues ont montré une sélectivité pour les PPARgamma 1000 fois plus importante que celle pour les PPARalpha ou delta (293). Le GW 1929 (voir figure 6C) a montré une activité antihyperglycémique chez les rats équivalente à celle de la troglitazone mais à des concentrations plasmatiques 100 fois moindres que celles de la troglitazone (31, 111). Ces résultats sont parallèles à la différence de leur capacité de liaison aux PPARgamma et de leur activation. Dans ces mêmes séries expérimentales, les (S)-énantiomères avaient une plus grande affinité pour lier les PPARgamma que les (R)-énantiomères (111).

Une grande diversité structurale des agonistes des PPARgamma a été décrite dans la littérature. Le GW 0207, un dérivé 2,3-disubstitué de l'acide indole-5 acétique, constitue un agoniste potentiel et sélectif des PPARgamma (118). Berger a rapporté des séries de dérivés de l'acide phénylacétique comme le L-796440 qui a montré une activité potentielle des PPARgamma (16). Le L-796440 a montré à la même concentration une même affinité pour les PPARalpha et les PPAR delta, il a été alors considéré comme étant le premier exemple d'agoniste potentiel des trois sous-types des PPARs (293).

Dans les essais de transactivation, le LY 171883, un antagoniste du récepteur LTD4, activait également les PPARgamma à des concentrations micromolaires (150, 84). À des concentrations micromolaires, l'indométhacine, un inhibiteur de la cyclooxygénase, s'est montré capable de se lier aux PPARgamma et de les activer (168). Il a été également démontré que cet AINS pouvait promouvoir la

différenciation des adipocytes à des concentrations similaires à celles requises pour activer les PPARgamma (287, 153). Plusieurs AINS, comme l'ibuprofène, le fénoprofène et l'acide flufénamique, se sont montrés des agonistes faibles des PPARgamma (168). Cependant, il est important de noter que l'interaction de ces substances avec les PPARgamma parvient à des concentrations plus grandes que celles requises pour inhiber la cyclooxygénase ou antagoniser le récepteur LTD4 (293).

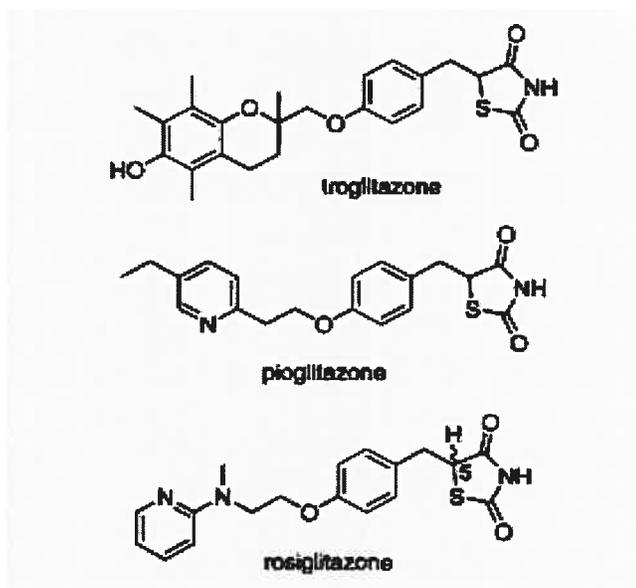
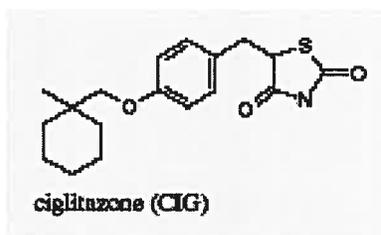


Figure 6 A. Structures de quelques ligands synthétiques des PPARgamma

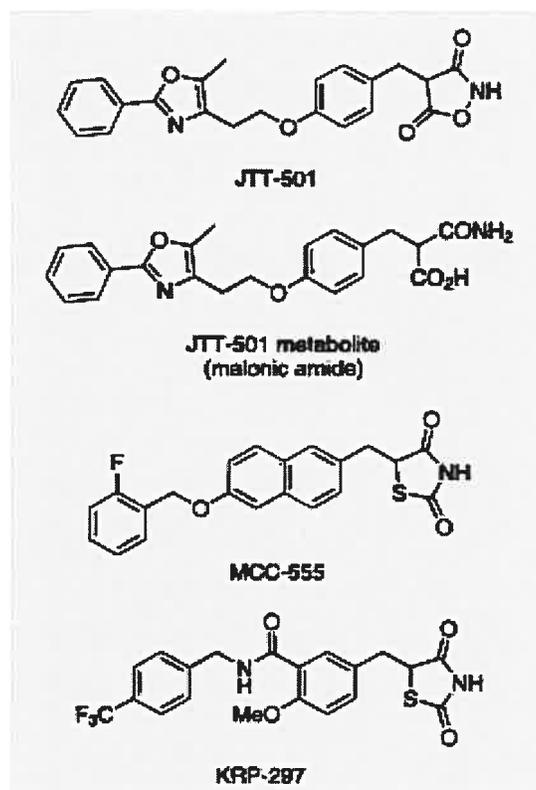


Figure 6 B. Structures de quelques ligands synthétiques des PPARgamma

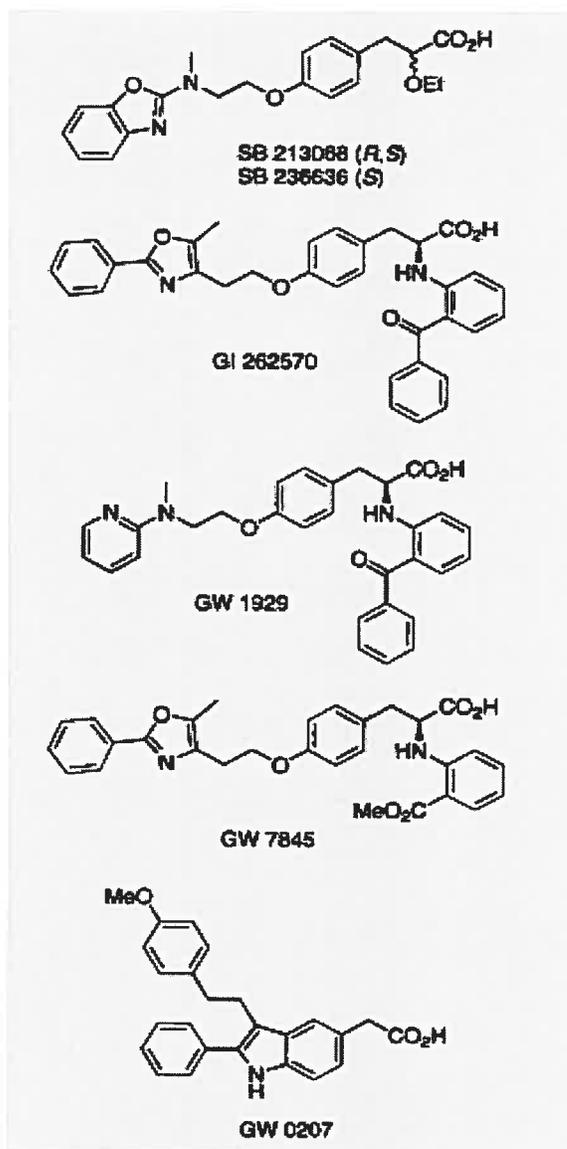


Figure 6 C. Structures de quelques ligands synthétiques des PPARgamma.

- **Sécurité et tolérance des TZDs :**

L'utilisation des TZDs est associée à un gain du poids (301). Chez certains patients, il y a également rétention de fluides et augmentation du volume plasmatique, ce qui mène à des œdèmes périphériques (301). L'œdème a été rapporté dans 4-6 % des cas traités par TZDs comparativement à 1-2 % des cas traités par placebo ou par une autre thérapie hypoglycémiante (301). Le gain de poids et les œdèmes sont associés à une insuffisance cardiaque des patients traités par TZDs (301). L'utilisation des TZDs est également associée à une légère diminution des taux d'hémoglobine et d'hématocrite chez les patients traités par TZDs. Cette diminution est sans conséquence clinique (301). Dans 13 études double-aveugle, 1.91% des 2510 patients, 0.26% des 1526 patients et 0.17% des 3503 patients recevant respectivement la troglitazone, la pioglitazone ou la rosiglitazone avaient les valeurs d'aminotransférase augmentées de 3 fois plus que les valeurs normales (163). L'activité d'alanine aminotransférase était augmentée de 10 fois chez 0.68% des patients traités par rosiglitazone et ceci comparativement à des patients non traités par rosiglitazone ou par pioglitazone (301).

### **2.6.3-Agonistes partiels et antagonistes:**

Le GW0072 (voir figure 7), un nouveau ligand des PPARgamma, s'est montré un agoniste partiel dans les essais de transactivation et un inhibiteur de la différenciation des adipocytes dans les cultures cellulaires (206). Il représente 15-20% de l'efficacité de la rosiglitazone. Son ability réduite à recruter les coactivateurs (protéines CBP et SRC1) au récepteur est responsable de sa faible efficacité (206).

Les scientifiques chez Merck ont décrit également un agoniste partiel et irréversible des PPARgamma, le L-764406 (75). Cet agoniste partiel est

capable de se lier à la cystéine 285 sur l'hélice 3 des PPARgamma 1 (Cys 313 pour PPARgamma 2) par une liaison covalente (127). Dans les essais de transactivation, le L-764406 (voir figure 7) présente approximativement 25% de l'activité maximale obtenue avec les TZDs (127).

Le GW9662 (voir figure 7), un antagoniste sélectif et irréversible des PPARgamma dont l'activité a été testé au niveau des macrophages (127, 268).

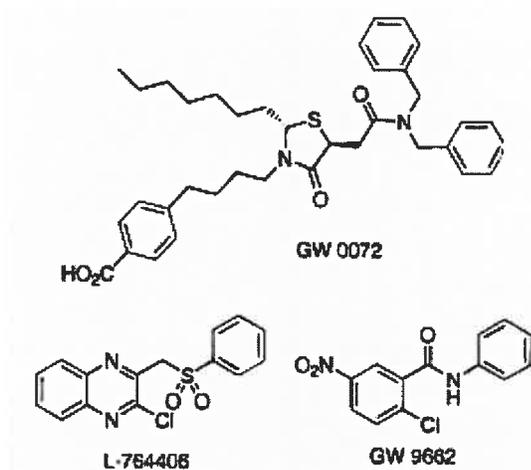


Figure 7. Structures de quelques agonistes partiels et antagonistes des PPARgamma

### ***3-Préconditionnement ischémique :***

#### ***3.1-Définition :***

En 1986, Murry et coll. ont été les premiers à étudier le phénomène du préconditionnement ischémique (PCI). Ils ont pu démontrer que de brèves périodes d'ischémie sont capables de protéger le cœur contre un long infarctus sévère (40 min, débit : 0 ml/min) (198). Le PCI est une sorte d'adaptation myocardique, ce phénomène conduit à une limitation de la nécrose du myocarde, une diminution de la sévérité des arythmies et du dysfonctionnement contractile postischémique (8, 198).

Kuzuya et coll. ont montré qu'une protection «biphasique» a été induite par une ischémie/reperfusion brève : la première est une phase immédiate correspondant au préconditionnement conventionnel (défini précédemment) ; la seconde phase est tardive survenant après une certaine période réfractaire d'environ 24 heures. Cette phase s'exprime également, en l'absence de toute autre intervention intercurrente, par une limitation significative de la taille de l'infarctus (157). Marber et coll. ont appelé cette phase de protection retardée : «seconde fenêtre de protection» ou «préconditionnement tardif» (185).

### 3.2-Mécanisme d'action :

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans le phénomène du PCI (protéines G, protéines kinases C et activation de la phospholipase) ainsi que plusieurs transmetteurs (bradykinine, endothéline et acétylcholine) (11). Dernièrement, il a été démontré que le PCI recrutait la PKC epsilon et que cette dernière confiait une cardioprotection via l'activation de la sphingosine kinase au niveau myocardique (139).

Plusieurs médiateurs capables d'induire un préconditionnement ont été identifiés, ces médiateurs varient selon les espèces animales utilisées. Une même approche pharmacologique a été utilisée par tous les auteurs. Elle consiste à démontrer : (1) que lorsqu'un antagoniste du récepteur testé est administré avant et/ou pendant les ischémies brèves inductrices chez les animaux préconditionnés, il abolit la limitation de taille de l'infarctus; et (2) qu'un agoniste dudit récepteur est capable d'induire à lui seul un préconditionnement s'il est administré à la place des ischémies brèves inductrices. Cette démonstration a été effectuée pour les récepteurs opioïdes, les récepteurs  $\alpha$ 1-adrénrgiques, les récepteurs ET1 de l'endothéline, les canaux  $K_{ATP}$ , les récepteurs de l'adénosine (A1, A3), les récepteurs B2 de la bradykinine, les récepteurs AT1 de l'angiotensine, les récepteurs sensibles à l'étirement, les récepteurs M2-muscariniques (7, 289, 307). Il est important de noter que l'administration d'un bloqueur des canaux  $K_{ATP}$ , le glibenclamide, abolit l'effet du préconditionnement observé suite à l'administration d'agonistes des récepteurs A1 de l'adénosine, des récepteurs de l'endothéline et des mécanorécepteurs sensibles à l'étirement. Cela suggère que la protection myocardique induite par l'activation de ces récepteurs passe par l'activation secondaire des canaux  $K_{ATP}$ .

La protéine-kinase C (PKC) semble être le candidat théorique pour faire le lien entre le(s) récepteur(s) membranaire(s) activé(s) et l'effecteur  $K_{ATP}$ .

Plusieurs travaux ont soutenu l'hypothèse suggérant l'implication de la PKC dans le préconditionnement. Une ischémie brève provoque la translocation de la PKC du cytosol vers la membrane cellulaire du cardiomyocyte chez le rat (258). Speechly et coll. ont utilisé le modèle de cœur de rat isolé. Ils ont rapporté la possibilité de bloquer l'effet protecteur du préconditionnement par administration de chéléréthrine (inhibiteur de la PKC) ou de reproduire cet effet en administrant le diacylglycérol (DAG), un activateur de la PKC (253). Une étude faite chez le lapin, par Ytrehus et coll. a pu démontrer que l'administration *in vivo* d'un inhibiteur (non spécifique) de la PKC, la staurosporine, pouvait empêcher le préconditionnement (303). Ces mêmes auteurs ont montré, en utilisant le modèle du cœur de lapin isolé, qu'un activateur de la PKC, le PMA (4-phorbol-12-myristate-13 acétate) pouvait induire un préconditionnement. Il est par ailleurs établi que la plupart des différents récepteurs membranaires précédemment cités sont couplés à la PKC. Enfin, la PKC peut régler l'activité des canaux  $K_{ATP}$ . Plusieurs études faites récemment sur des cardiomyocytes ventriculaires de lapin, ont pu démontrer l'implication de la PKC dans la régulation de l'activité des canaux  $K_{ATP}$  (129, 175). Liu et coll. ont également observé que l'activation de la PKC entraîne une augmentation du courant  $IK_{ATP}$  induit par l'administration de pinacidil ou par inhibition métabolique (178). En théorie, il est donc envisageable que la PKC, qui est reliée aux différents récepteurs précités et règle en partie l'activité des canaux  $K_{ATP}$ , joue un rôle important dans le préconditionnement. Le rôle précis de la PKC dans le préconditionnement reste toutefois à établir. La démonstration d'une différence de translocation de la PKC au cours de l'ischémie prolongée entre myocardiocytes témoins et préconditionnés n'est pas faite. La PKC comporte en fait de nombreuses isoformes, variables selon les espèces et les tissus, dont le rôle respectif dans le préconditionnement myocardique reste à établir. Cependant, Ping et coll. ont montré récemment, dans un modèle de lapin éveillé, préconditionné, que de brefs épisodes d'ischémie/reperfusion augmentent de manière sélective la translocation du

cytosol vers la membrane des isoformes myocardiques  $\Sigma$  et  $\eta$  (219). La plupart des travaux impliquant la PKC, sur la base de l'utilisation de ses inhibiteurs et de ses activateurs, n'ont pas mesuré l'activité de l'enzyme. La PKC phosphoryle d'autres protéines comme les MAPK, les MAPKK (*MAPK kinases*), qui pourraient aussi jouer un rôle dans cette protection myocardique. En somme, des travaux complémentaires sont nécessaires pour préciser la place de la PKC dans le mécanisme du préconditionnement.

Les canaux  $K_{ATP}$  jouent un rôle clé dans le PCI (210). Plusieurs études ont démontré que les stimulateurs de l'ouverture des canaux potassiques (exemples : cromakaline, bimakaline, nicorandil, diazoxyde) induisaient une cardioprotection, tandis que les bloqueurs de ces canaux (exemple : 5-hydroxydecanoate, glibenclamide) inhibaient cette cardioprotection (105). Ces canaux ont été premièrement décrits au niveau du sarcolème des cardiomyocytes (204). Les courants sortant de ces canaux peuvent diminuer la durée du potentiel d'action, réduire l'influx calcique, préserver l'ATP et réduire la consommation de l'énergie durant l'ischémie tout en préservant la respiration mitochondriale et le métabolisme cellulaire (42). Un canal  $K_{ATP}$  présent au niveau de la membrane interne des mitochondries a été également impliqué dans la cardioprotection au cours de l'ischémie/reperfusion (8, 89, 90, 91). Les activateurs sélectifs du mito $K_{ATP}$  ont montré un effet fortement cardioprotecteur du préconditionnement myocardique (104). Récemment, la localisation d'un canal  $K_{Ca}$  à conductance élevée impliqué dans la cardioprotection contre l'ischémie/reperfusion a été localisée au niveau de la membrane interne des mitochondries (297). L'ouverture de ces deux canaux augmente la prise du potassium requis pour un fonctionnement optimal de la phosphorylation oxydative (155). La lidocaïne est un bloqueur des canaux sodiques et est utilisée comme traitement anti-arythmique chez des malades coronariens. La lidocaïne testée chez les rats, a pu empêcher l'effet bénéfique du PCI à des doses thérapeutiques par blocage des canaux  $K_{ATP}$ . Pour cela, la lidocaïne pourrait présenter un risque potentiel chez les patients présentant une maladie

cardiaque coronarienne (209). Ceci peut expliquer l'augmentation du taux de mortalité chez les patients présentant un infarctus myocardique et traités par lidocaïne comme traitement prophylaxique (8).

Les mPTP (mitochondrial permeability transition pore) sont un complexe de multiprotéines formé au niveau des sites de contacts entre les parois internes et externes des mitochondries (131). L'ouverture de ces pores induit l'apoptose et la nécrose (57, 156). Ces pores s'ouvrent durant les premières minutes de la reperfusion (101, 102), cela ayant pour effet d'endommager le myocarde (102, 103, 108). Le blocage de l'ouverture des mPTP confie une cardioprotection similaire à celle du PCI (114, 115, 138). L'hypothèse que l'activation des  $K_{Ca}$  est impliquée non seulement dans la cardioprotection contre l'ischémie/reperfusion mais également dans la cardioprotection du PCI a été testée par Cao et coll. (42). Cette étude a démontré que les  $K_{Ca}$  sont réellement impliqués dans la cardioprotection du PCI et que ce mécanisme impliquait le blocage des mPTP (42).

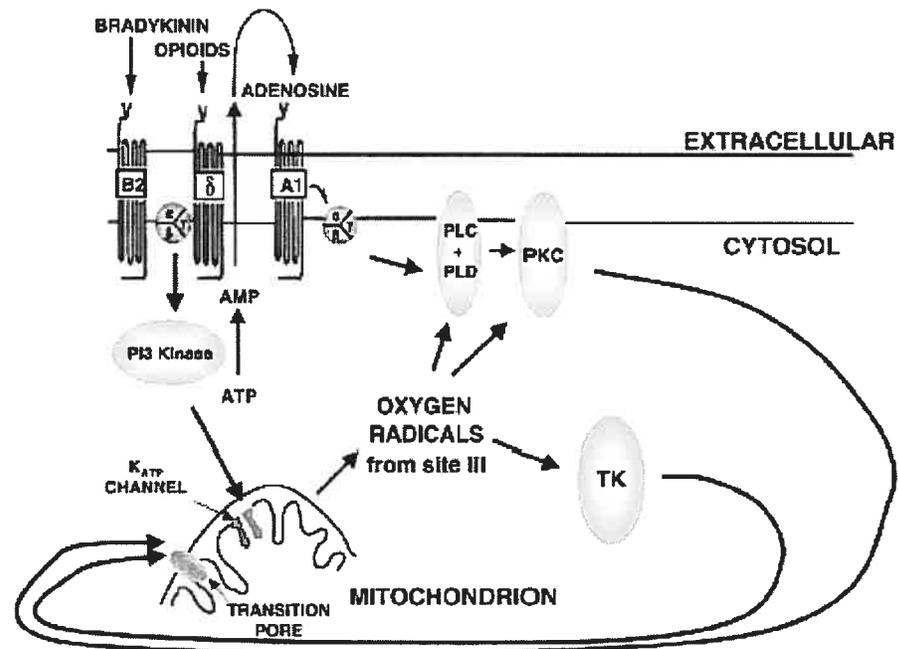


Figure 8. Schéma proposé par Yellon M. et Downey JM pour un PCI classique (Yellon M et Downey JM 2003). Le récepteur opioïde delta ainsi que le récepteur à la bradykinine B2 se couplent à la protéine kinase C (PKC) et à la tyrosine kinase (TK) via 1) la phosphoinositol (PI)-3 kinase, 2) les canaux K<sub>ATP</sub> mitochondriaux et 3) les radicaux d'oxygène, alors que l'adénosine A1/A3 s'y lie directement. Les kinases agissent alors sur l'effecteur final, possiblement sur les K<sub>ATP</sub> mitochondriaux directement afin de prévenir l'ouverture d'un pore mitochondrial de transition.

Le phénomène, appelé «seconde fenêtre de protection» ou préconditionnement tardif, a été moins étudié que le préconditionnement précoce. Il semble conférer une protection de nature parfois différente. Sun et coll. ont montré, sur le modèle du porc éveillé, que le préconditionnement retardé protège contre la sidération myocardique (*myocardial stunning*) mais pas contre l'infarctus (262). Cette protection est donc en miroir par rapport au préconditionnement précoce qui limite la taille de l'infarctus mais n'atténue par le *stunning*. Le mécanisme de cette protection retardée reste très mal connu. Naturellement, son délai d'apparition a fait évoquer une relation avec la nécessité d'une synthèse *de novo* de protéines ou des modifications post-traductionnelles de l'activité de certaines protéines. Les candidats évoqués sont les proto-oncogènes, les antioxydants intracellulaires, les protéines de *stress* ou encore la monoxyde d'azote synthase (NOS). La protéine HSP70 inducible (HSP70i) a été la plus étudiée ; le contenu myocardique d'ARNm d'HSP70i est augmenté après une agression ischémique brève (71). La transfection d'HSP70 humaine dans le coeur de rat augmente la tolérance à une ischémie prolongée (263). Ces études suggèrent mais ne prouvent pas le lien de cause à effet entre ces protéines et la protection conférée ; en effet, il faudrait démontrer que le blocage de la synthèse d'HSP70 empêche l'effet cardioprotecteur observé chez des animaux préconditionnés. Malgré tout, les voies de signalisation cellulaire activant la synthèse de HSP70 semblent en partie communes avec celles impliquées dans le préconditionnement précoce. En particulier, l'activation de la PKC semble aussi intervenir dans le préconditionnement retardé. L'administration de chélérythrine (inhibiteur de la PKC) pendant la phase d'induction empêche l'apparition de la protection retardée chez le lapin (10). Le lien entre PKC et les protéines éventuellement impliquées dans la seconde fenêtre de protection reste cependant à déterminer. Enfin, récemment, Bolli et coll. ont montré, dans un modèle de préconditionnement tardif chez le lapin

éveillé, que le NO peut être à la fois un inducteur et un médiateur de la protection (27).

### ***3.3-Les conséquences fonctionnelles du préconditionnement***

Le préconditionnement réduit de façon importante l'étendue de la taille de l'infarctus. Il est donc possible qu'il atténue également les phénomènes délétères associés à l'ischémie et à la reperfusion : les arythmies ventriculaires et le dysfonctionnement contractile postischémique.

#### **3.3.1-La réduction des arythmies ventriculaires :**

Shiki et Hearse ont démontré que le préconditionnement limite de façon significative l'incidence des arythmies ventriculaires (tachycardie et fibrillation ventriculaires) chez le rat (248). Cet effet anti-arythmique est transitoire : son existence dans les autres espèces animales reste à établir. Vegh et coll. ont montré que le préconditionnement limite l'incidence des tachycardies et des fibrillations ventriculaires chez le chien (285). Cependant, ces travaux ne peuvent être considérés comme concluants puisque les auteurs n'ont pas mesuré le débit collatéral myocardique ni la taille de la zone à risque qui sont des déterminants principaux des arythmies ventriculaires dans ce modèle. Il a été récemment montré que, contrairement à ce qui a été observé chez le rat, le préconditionnement ne limite pas l'incidence des arythmies ventriculaires chez le porc. De plus, il a des effets potentiellement délétères puisqu'il abaisse le seuil de fibrillation ventriculaire, diminue la durée du potentiel d'action et accélère la survenue de fibrillation ventriculaire au cours de l'ischémie prolongée (211). Cependant, sur ce modèle, l'arythmie observée suite au préconditionnement n'est pas dû à l'activation des canaux  $K_{ATP}$  qui sont impliqués dans la diminution de la taille de l'infarctus par le préconditionnement dans certaines préparations expérimentales (233). En somme, l'effet anti-arythmique du préconditionnement reste incertain dans les

espèces autres que le rat et les mécanismes de l'effet du préconditionnement sur l'arythmogénèse ventriculaire demandent à être précisés.

### **3.3.2-L'atténuation de la fonction contractile post-ischémique**

La fonction du ventricule gauche est un déterminant essentiel du pronostic vital après infarctus. L'analyse des effets du préconditionnement sur la récupération fonctionnelle post-ischémique est complexe mais peut se résumer à deux questions : (1) le préconditionnement améliore-t-il le dysfonctionnement contractile régional après infarctus du myocarde ? (2) Cet effet est-il dû à un effet propre du préconditionnement sur la contractilité ou est-il seulement lié à la diminution de l'étendue de la zone infarctée ? L'amélioration de la fonction systolique post-ischémique semble, sur le plan expérimental, dépendre de la diminution de la taille de l'infarctus, les animaux préconditionnés récupérant mieux parce qu'ils ont des infarctus plus petits (53, 222). De plus, le préconditionnement ne semble pas avoir d'effet bénéfique propre sur la contractilité. En effet, les coeurs de chiens ayant subi une occlusion coronaire de 15 minutes (n'induisant pas de nécrose) ont une fonction contractile post-ischémique semblable qu'ils aient ou non été préconditionnés (212).

## **4. Cannabinoïdes :**

### **4.1-Définition :**

La plante *Cannabis Sativa* ou Chanvre Indien est utilisée depuis plus de 4000 ans pour traiter divers signes ou maladies : la migraine, l'épilepsie, le glaucome, la douleur, les crampes musculaires. De cette plante a pu être extrait le *Cannabis* ou marijuana, utilisé de manière illicite. Le composé principal du cannabis est le delta<sup>9</sup>-tétrahydrocannabinol (delta<sup>9</sup>-THC). Cette substance agit sur des récepteurs spécifiques (les récepteurs cannabinoïdes). Les cannabinoïdes présentent plusieurs propriétés : analgésique, anti-inflammatoire, et immunosuppressive (188). L'ensemble de composés lipidiques naturels et synthétiques qui exercent des effets similaires à ceux du cannabis, est appelé cannabinoïdes

### **4.2-Les cannabinoïdes et leurs récepteurs**

Deux récepteurs ont été clonés et séquencés :

- **Les CB1** (94, 186), principalement représentés dans le système nerveux central et tout particulièrement dans le cortex cérébral, le striatum, l'hippocampe et le cervelet (120, 277) Bien qu'ils soient exprimés dans les astrocytes en culture primaire (239, 240), les CB1 sont majoritairement neuronaux (66). L'ARNm des CB1 a été démontré au niveau de certains tissus périphériques (88) ; pourtant les études de liaison (*radioligand*) sur des tissus périphériques se sont montrées négatives pour les sites de liaison aux cannabinoïdes (181). La présence des récepteurs CB1 a été caractérisée par des méthodes pharmacologiques au niveau des nerfs cholinergiques périphériques et

au niveau des afférents sensoriels (56, 229, 230). Leur présence au niveau cardiaque a été démontré par immunobuvardage (Western blot) (29).

- **Les CB2** (196) présentent 44% d'homologie avec les CB1 (50). Principalement exprimés au niveau de certaines cellules du système immunitaire (196) dont la microglie (288) ils seraient responsables des effets immunomodulateurs des cannabinoïdes (149, 259). Les taux d'ARNm des CB2 sont très élevés au niveau des cellules B, des tueuses naturelles (*natural killers*), les monocytes et des cellules T (88). Les souris déficientes en CB2 présentent des troubles au niveau du système immunitaire, reliés à un dysfonctionnement des macrophages (34).

La découverte de récepteurs (endogènes) au cannabis (exogène) a conduit à l'identification de composés lipidiques endogènes qui se lient sélectivement sur ces récepteurs cannabinoïdes, tant dans le cerveau que dans les tissus périphériques. Ces ligands, agonistes des récepteurs, sont appelés les endocannabinoïdes. Les cannabinoïdes naturels et synthétiques ont le potentiel de réduire la nociception, l'inflammation et la douleur due à l'inflammation (188).

Les récepteurs CB1 et CB2 ont été caractérisés et clonés, ils se différencient par leur séquence acides aminés, leur distribution tissulaire, leurs rôles physiologiques et leurs mécanismes de signalisations. Les récepteurs CB1 sont surtout impliqués dans l'analgésie, tandis que les récepteurs CB2 sont impliqués le plus dans l'inflammation (34, 56).

#### 4.3-Mécanisme d'action :

Les récepteurs aux cannabinoïdes font partie de la superfamille des récepteurs à 7 passages transmembranaires couplés aux protéines G (66, 216). Par ce couplage, les récepteurs CB1 et CB2 inhibent l'adénylate cyclase et diminuent ainsi les taux intracellulaires d'AMP cyclique (94, 186, 251). La stimulation des récepteurs CB1 active de nombreuses voies de signalisation intracellulaire dans le système nerveux central (63, 65, 67, 283) et régule la fonction de canaux ioniques en activant certains canaux potassiques (60) et en inhibant certains canaux calciques (183), diminuant ainsi l'excitabilité neuronale. Cette régulation des canaux ioniques et la localisation pré-synaptique préférentielle des récepteurs CB1 expliquent les effets inhibiteurs des cannabinoïdes sur la libération de neurotransmetteurs (66). Une grande variété de kinases intracellulaires sont activées suite à l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes, Citons les MAPKs : ERK 1 et 2 (*extracellular signal-regulated kinases type 1 et 2*) (28, 67), p38 MAPK (63), JNK (*JUN N-terminal kinase*) (236), PKB ou Akt (proteïn kinase B) (101) et FAK (*focal adhésion kinase*) (64).

Deux études ont été réalisées sur des souris dont le gène codant pour le récepteur CB1 a été invalidé (166, 308). Ces études ont donné des résultats discordants vis-à-vis de l'activité des souris (166, 308). Malgré ces résultats discordants, les effets des cannabinoïdes naturels et synthétiques sur le système nerveux central disparaissaient complètement ou quasi-complètement chez les de souris pour les deux études, ce qui montre que le récepteur CB1 est bien le principal récepteur cannabinoïde présent dans le système nerveux central. Certains travaux ont toutefois rapporté que l'effet des cannabinoïdes peut être médié par des récepteurs autres que les CB1 et CB2. Aucun récepteur CB3 n'a

jusqu'à présent été cloné. La présence d'un isoforme CB1a du récepteur CB1 a été également démontrée, CB1a possédant des propriétés pharmacologiques similaires au CB1 (231, 232).

#### ***4.4-Ligands endogènes :***

L'expérience des chercheurs avec les récepteurs opioïdes et les enképhalines les a habitués à l'idée qu'à chaque fois qu'un récepteur est présent dans le corps des facteurs endogènes pouvant activer ce récepteur y sont présents également. Dès que les récepteurs aux cannabinoïdes ont été décrits, des recherches concernant leurs ligands endogènes naturels ont commencé. Les chercheurs ont supposé que les ligands endogènes aux récepteurs cannabinoïdes, comme les autres neurotransmetteurs et les autres neuromodulateurs, sont sécrétés du tissu cérébral d'une manière dépendante du calcium (267). En suivant cette hypothèse, Howlett et coll. ont incubé des tranches cérébrales de rat en présence d'un calcium ionophore (pour marquer le CP-55940, un agoniste cannabinoïde) et ont déterminé si le milieu d'incubation contenait ou non un facteur qui déplaçait la liaison du CP-55940 marqué, aux membranes cérébrales. Ces études ont pu démontrer que certainement une activité *cannabinoid-like* a été sécrétée par les tranches cérébrales stimulées. Les quantités minimales de ce facteur n'ont pu permettre aux chercheurs d'élucider sa structure chimique (78, 79).

Devane, Mechoulam et coll. (70, 190), ont adopté une stratégie différente. Ils pensaient que les endocannabinoïdes peuvent être aussi hydrophobes que le delta<sup>9</sup>THC (voir figure 10). Ils ont mis des cerveaux porcins dans un solvant organique (le toluène) pour obtenir un extrait lipidique, ils ont ensuite fractionnés l'extrait lipidique par des techniques chromatographiques tout en mesurant l'activité de liaison cannabinoïde. Cette approche a été un grand succès, les chercheurs ayant pu isoler un agent lipidique *cannabinoid-like*, le caractériser par spectrophotométrie de masse et par spectroscopie magnétique et nucléaire de résonance. Cet agent était un éthanolamide de l'acide arachidonique, nommé anandamide.

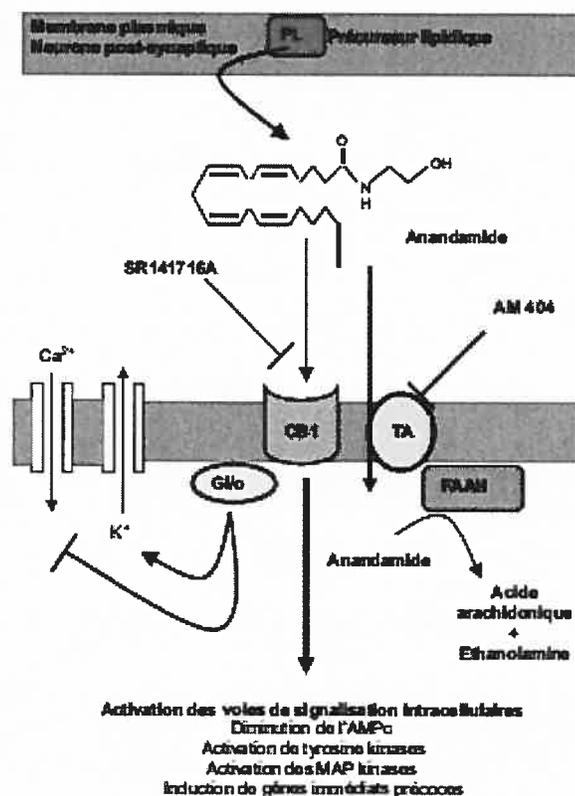


Figure 9. Synthèse, libération et dégradation de l'anandamide (Derkinderen P et al 2004). L'anandamide est produit après hydrolyse d'un précurseur lipidique de la membrane plasmique, par une phospholipase. Dans l'espace intercellulaire, l'anandamide peut activer les récepteurs CB1. L'activation de ces récepteurs régule de nombreuses voies de signalisation intracellulaires, active les canaux potassiques et inhibe les canaux calciques. Le SR141716A est un antagoniste spécifique des récepteurs CB1. L'inactivation de l'anandamide se fait grâce à l'action couplée d'un transporteur spécifique (TA, transporteur de l'anandamide) et d'une amidohydrolase (FAAH, fatty acid amino hydrolase) liée à la membrane plasmique. Un inhibiteur du transport de l'anandamide, l'AM404 est disponible. L'anandamide, sous l'effet de la FAAH, est hydrolysé en acide arachidonique et ethanolamine.

La synthèse chimique de l'anandamide a confirmé son identification structurale et a permis la caractérisation de ses propriétés pharmacologiques (85). In vitro et in vivo, les tests ont montré une grande similarité d'action entre l'anandamide et les drogues cannabinoïdes (267). L'anandamide réduit la contraction électrogénique chez la souris et reproduit toutes les réponses observées avec le delta<sup>9</sup>THC in vivo. Chez le rat l'anandamide était capable de produire une analgésie, une hypothermie et une hypomotilité. Cependant, ces effets peuvent ne pas être exclusivement dus suite à l'activation seule des récepteurs cannabinoïdes. En réalité, l'anandamide est métabolisé en acide arachidonique qui peut être converti en une grande variété d'eicosanoïdes biologiquement actifs (267). Plusieurs études ont démontré que l'anandamide est sécrété par les neurones cérébraux d'une façon dépendante de l'activité (72, 97). Les voies biochimiques de formation et d'inactivation de l'anandamide au niveau du système nerveux central ont pu être également élucidé (14, 37, 54, 72). Pour cela, l'anandamide a tous les critères pour être défini comme une substance cannabinoïde endogène (267).

En 1992, Devane, Mechoulam et coll. (189) ont rapporté que plusieurs fractions lipidiques extraites du cerveau des rats contenaient une activité de liaison cannabinoïde, en plus de celle attribuable à l'anandamide. En caractérisant ces fractions, ils ont découvert que certaines d'entre elles contenaient des acides gras insaturés éthanolamides similaires à l'anandamide (exemple : eicosatrienylethanolamide), alors que d'autres étaient composées d'un lipide différent, le sn-2-arachidonyle-glycérol (2-AG) (189). Sugiura et coll. ainsi que Stella et coll. (261, 255, 256) sont arrivés indépendamment à la même conclusion que les acides gras polyinsaturés éthanolamides qui sont très similaires structurellement à l'anandamide doivent reproduire ses même effets.

Le 2-AG (voir figure 10) est présent au niveau du cerveau à des concentrations beaucoup plus élevées que l'anandamide, il peut lier les récepteurs CB1 et CB2 avec une même affinité, c'est un agoniste complet des

récepteurs CB1, tandis que l'anandamide se comporte comme un agoniste partiel (267).

- **Les acides gras éthanolamides n'interagissant pas avec un récepteur cannabinoïde connu :**

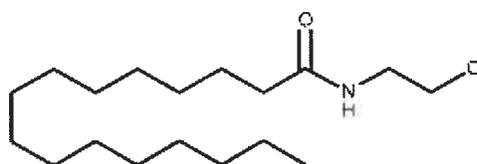
Le précurseur de l'anandamide, le N-arachidonyl palmitoyléthanolamide, appartient à la famille des dérivés N-acétylés qui contient une variété d'acides gras saturés et insaturés qui sont à leur tour liés à un éthanolamine, d'où correspond le nom *fatty acid ethanolamide (FAE)* (267). Ces composés ne lient pas les récepteurs CB1 mais ils jouent un rôle important dans plusieurs de fonctions biologiques. Ils ont également beaucoup d'effets remarquables (267). In vivo, le palmitoyléthanolamide PEA exerce un profond effet analgésique et anti-inflammatoire. Ceci a été attribué à sa capacité de lier un site récepteur qui a une affinité pour l'antagoniste SR144528, antagoniste préférentiel des récepteurs CB2 (38, 80, 135, 187). L'identité moléculaire de ce site demeure inconnue, mais il est peut être différent du récepteur CB2 pour lequel le gène a été cloné (196). Le PEA est trouvé à des taux élevés au niveau de la peau et d'autres tissus. Avec l'anandamide, le PEA peut participer au contrôle périphérique de l'initiation de la douleur (38).

Malgré sa similarité chimique avec le PEA (voir figure 10), l'oléoyléthanolamide OEA présente une faible propriété analgésique (39). Il été suggéré que l'OEA peut être impliqué dans la régulation de l'appétit (234).

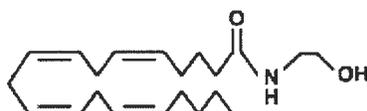
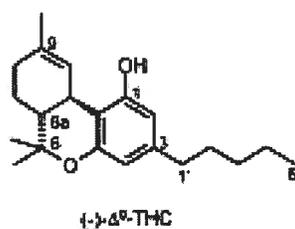
- **Autres agonistes endogènes des récepteurs aux cannabinoïdes :**

Une série d'analogues structuraux de l'anandamide avec une activité au niveau des récepteurs cannabinoïdes a été isolée du tissu cérébral. Ces composés, qui incluent l'eicosatriénoyléthanolamide et le docosatetraénoyléthanolamide (111), peuvent être générés par la même voie enzymatique que l'anandamide mais en plus petites quantités.

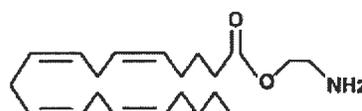
Récemment, deux ligands endogènes probables des récepteurs cannabinoïdes très distincts des acides gras polyinsaturés éthanolamides et du 2-AG ont été identifiés au niveau cérébral : le 2-arachidonyl-glycerol-ether ou noladine éther (voir figure 10) (110) et le O-arachidonyl-éthanolamine ou virodhamine (221). La noladine éther a été isolée du cerveau de porc et a été identifiée en utilisant une combinaison de spectrophotométrie de masse, de résonance magnétique nucléaire et de synthèse chimique. La noladine lie les récepteurs CB1 avec une grande affinité (constante de dissociation  $K_D$  21 nM) et produit des effets cannabinoïd-like chez la souris *in vivo* (sédation, immobilité, hypothermie et antinociception) (110). La virodhamine (voir figure 10) a été identifiée au niveau du cerveau chez le rat par spectrophotométrie de masse et par synthèse chimique, elle s'est montrée capable d'activer faiblement les récepteurs CB1 dans une essai de liaison marquée radioactivement au guanosine5'-O-(3-thiotriphosphate) (*S-labeled guanosine5'-O-(3-thiotriphosphate) (GTP $\gamma$ S) binding assay*), elle s'est également comportée comme agoniste partiel (221). La virodhamine était capable de diminuer la température corporelle chez la souris bien qu'elle soit moins efficace que l'anandamide (221). Il faut par contre tenir compte d'un facteur important dans ces études, c'est que la virodhamine en milieu aqueux est instable et rapidement convertie en anandamide (voir figure 10). La formation et l'inactivation de ces molécules ainsi que leur effets physiologiques sont sujets à de nombreuses investigations (81).



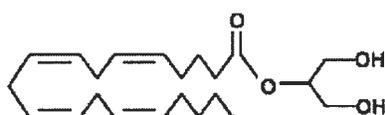
**Palmitoylethanolamide**



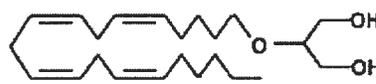
**Anandamide**



**Virodhamine**



**2-Arachidonoylglycerol**



**Noladin ether**

Figure 10. Structures de quelques acides gras éthanolamides et d'endocannabinoïdes

#### ***4.5-La sécrétion, le transport et la dégradation des endocannabinoïdes :***

Les endocannabinoïdes ont en commun de ne pas être, à proprement parler, des neurotransmetteurs. En effet, il a été montré que l'anandamide et le 2-AG, contrairement aux neurotransmetteurs, ne sont pas stockés dans des vésicules synaptiques, mais sont produits suite à une demande après clivage de précurseurs lipidiques présents dans les membranes plasmiques (20, 21, 36, 37). Le 2-AG et l'anandamide sont des molécules hydrophobes et leur passage en milieu extracellulaire aqueux ne doit pas être facile. Des expériences ont montré que 40% du précurseur de l'anandamide, le N—arachidonoyl PE, est localisé au niveau de la surface cellulaire (37), on y trouve également des précurseurs du 2-AG comme le phosphoinositol phosphate et le phosphoinositol biphosphate (272). Ceci suggère que ces deux endocannabinoïdes peuvent être générés au niveau de la membrane plasmique (267). Comme pour les autres composés lipidiques, leur diffusion peut se faire d'une façon passive ou peut être facilitée par des protéines pouvant lier les lipides comme les lipocalins (4). L'existence de différentes voies de synthèse de l'anandamide et du 2-AG suggère que ces deux endocannabinoïdes peuvent, en principe, opérer indépendamment l'un de l'autre. Cette idée est supportée par trois découvertes :

- 1- Premièrement, la stimulation électrique des tranches de l'hippocampe augmentait les taux de 2-AG mais pas ceux de l'anandamide (256).
- 2- L'activation des récepteurs à la dopamine D<sub>2</sub> au niveau du striatum induisait la sécrétion de l'anandamide mais pas du 2-AG (98).
- 3- L'activation des récepteurs NMDA au niveau des neurones corticaux en culture augmentait les taux de 2-AG mais n'avait aucun effet sur la formation de l'anandamide, qui requiert en effet la stimulation des récepteurs  $\alpha$ -7 nicotiques et des récepteurs NMDA en même temps (255).

Jusqu'à présent, il n'est pas clair si la génération d'un type particulier d'endocannabinoïde est relié aux différences régionales corporelles ou à

certains mécanismes reliés à l'activation de récepteurs spécifiques ou les deux (267).

Nous avons pu déterminer pour l'anandamide un système de recaptage spécifique et une enzyme de dégradation constituant un système de dégradation efficace. Le transporteur de l'anandamide n'a pas été cloné, mais son importance physiologique a été montrée grâce à l'utilisation d'un inhibiteur, l'AM-404, qui potentialise les effets analgésiques de l'anandamide (13, 14). Une fois dans la cellule, l'anandamide est immédiatement dégradée en acide arachidonique et éthanolamine par une *Fatty Acid Amide Hydrolase* (FAAH), qui a été purifiée et clonée (54). De façon remarquable, cette enzyme est essentiellement présente dans les régions cérébrales riches en récepteurs CB1 telles le cortex, l'hippocampe, le striatum et le cervelet (271).

Plusieurs études ont investigué la possibilité que le 2-AG et l'anandamide soient transportés par les mêmes mécanismes (12, 20). Bien que ces deux molécules semblent utiliser au moins un système de transport en commun, leur transport peut être affecté par leur taux de dégradation intracellulaire (267).

Le fait que la FAAH catalysait l'hydrolyse du 2-AG et de l'anandamide a suggéré l'hypothèse que la FAAH est également responsable de l'élimination des deux endocannabinoïdes. Cependant, une évidence semble affaiblir cette hypothèse. En effet, les inhibiteurs de l'activité de la FAAH n'avaient aucun effet sur l'hydrolyse du 2-AG marqué ( $^3\text{H}$ )2-AG; bien que ces inhibiteurs aux mêmes concentrations ont pu inhiber complètement la dégradation de l'anandamide (12). En plus, l'hydrolyse du 2-AG a pu être préservée chez les souris invalidées FAAH<sup>-/-</sup>. Chez ces souris, on a remarqué qu'il n'y a pas eu de dégradation de l'anandamide endogène ou exogène (174). En accord avec ces résultats, une activité 2-AG hydrolase différente de la FAAH a été identifiée et partiellement purifiée du cerveau de porc (100). Le plus probable, c'est que cette activité correspond à la monoglycéride lipase (MGL), une enzyme cytosolique (sérine hydrolase) qui peut convertir les 2- et les 1-monoglycérides

en acides gras et glycérol (144). Plusieurs découvertes supportaient cette conclusion (73). L'expression hétérologue cérébrale de MGL chez le rat a montré une forte activité hydrolysante le 2-AG, sans aucun effet sur la synthèse du 2-AG ou sur la dégradation de l'anandamide. L'ARNm et la protéine de la MGL sont discrètement distribués au niveau cérébral chez le rat, avec une plus grande concentration dans les régions où les récepteurs CB1 sont présents (73).

#### ***4.6-Relation structure - activité :***

L'anandamide et le 2-AG partagent plusieurs points structuraux en commun :

- Une chaîne d'acides gras fortement hydrophobe
- Un amide (anandamide), ou un ester (2-AG)
- Un groupe d'extrémité polaire

Les modifications systématiques au niveau de la chaîne de carbone hydrophobe indiquent que les éléments structuraux nécessaires pour la reconnaissance du substrat par le transporteur de l'anandamide peuvent être différents de ceux nécessaires pour sa translocation (267). La reconnaissance du substrat peut exiger au moins la présence d'une double liaison *Cis* au milieu de la chaîne d'acides gras, indiquant ainsi sa préférence pour des substrats (ou inhibiteurs compétitifs) avec une chaîne d'acides gras qui peuvent adopter des changements conformationnels en U (220). Cependant, un minimum de quatre doubles liaisons *Cis* non conjuguées peuvent être requis pour la translocation, suggérant que la conformation d'*épingle* fermée est nécessaire pour que les substrats soient transportés à travers la membrane (220). Les études de modèles moléculaires ont montré que le transport de substrats, comme l'anandamide et le 2-AG, obéit aux deux conformations à faible énergie, *épingle* ou *étendue* (220). Cependant, les conformations *étendues* et pas *épingles* peuvent être

thermodynamiquement favorisées pour les pseudo-substrats comme l'oléoyléthanolamide, qui peut déplacer le ( $^3\text{H}$ ) anandamide du transport sans qu'il soit internalisé (220, 227).

Les effets des modifications des groupes d'extrémités sur le transport de l'anandamide a été également investigué (137, 220). Les résultats suggèrent que la reconnaissance du ligand peut être maintenue même si le groupe de tête est enlevé (exemple : arachidonamide) ou remplacé par un groupe substantiel (exemple : AM404) ou même quand des liaisons esters remplacent les liaisons amides (exemple : 2-AG). Apparemment, la reconnaissance d'un ligand est particulièrement favorisée en remplaçant le groupe éthanolamide par un groupe hydroxyphényl (exemple : AM404 et son dérivé, le N-(2-méthyl-4-hydroxyphényl) arachidonamide) (14, 62) ou par un groupe furane (180).

De nombreuses investigations structure-activité systématiques ont identifié les éléments nécessaires pour la reconnaissance du substrat par FAAH. Premièrement, FAAH accommode une grande variété de substrats acides gras amides, mais la diminution du nombre des doubles liaisons dans la chaîne d'acides gras résulte généralement en une diminution du taux d'hydrolyse (25, 26). En plus, le remplacement de la partie éthanolamine avec un amide primaire produit d'excellents substrats (160). Par exemple, le taux d'hydrolyse de l'arachidonamide est 2 à 3 fois plus grand que l'anandamide (25, 158). Les dérivés de l'anandamide contenant un azote tertiaire dans leur partie éthanolamine sont des faibles substrats de la FAAH (160). L'introduction d'un groupe méthyl sur les positions C2, C1' ou C2' de l'anandamide produit des analogues qui sont résistants à l'hydrolyse. Cette résistance est probablement due à l'augmentation de l'encombrement stérique autour du groupe carbonyle (1, 160). La reconnaissance du substrat par le site actif de la FAAH est stéréosélectif, au moins pour les dérivés d'acides gras éthanolamide contenant un groupe méthyl sur les positions C1' ou C2' (1, 160). Finalement, les esters d'acides gras comme le 2-AG peuvent aussi être d'excellents substrats pour l'activité FAAH *in vitro* (100, 214).

#### ***4.7-Effets des cannabinoïdes :***

##### **4.7.1-Effets analgésiques des cannabinoïdes :**

L'analgésie est un effet des cannabinoïdes très bien documenté aussi bien au niveau animal qu'humain, cet effet impliquant des mécanismes multiples (215). Les récepteurs CB1 médient les effets analgésiques des cannabinoïdes, ces effets peuvent être inhibés par un antagoniste sélectif de ces récepteurs (216). Les cannabinoïdes potentialisent l'effet analgésique des opioïdes en activant les récepteurs kappa-opioïdes (216). L'anandamide, un dérivé cannabinoïde, exerce des effets analgésiques qui paraissent indépendants de l'activation des récepteurs CB1 (216). Des faibles doses de cette substance produisent une hyperalgésie et des fortes doses produisent une analgésie (216). Les effets sur la sécrétion de certaines cytokines pro ou anti-inflammatoires peuvent contribuer aux effets antinociceptif des agents cannabinoïdes (216). Ces mécanismes d'action multiples peuvent expliquer la large utilisation du cannabis par des patients présentant des maux chroniques (216). Une étude faite récemment au Canada a montré que 10% des patients présentant des maux chroniques utilisent le cannabis (290).

##### **4.7.2-Effets des cannabinoïdes sur le système immunitaire :**

Les cannabinoïdes peuvent induire ou arrêter la prolifération cellulaire (182). A faibles concentrations, ils inhibent la prolifération des cellules B, cet effet étant médié par les récepteurs CB2. A fortes doses, ils induisent l'apoptose des cellules B (216). A cause de cet effet proapoptotique, les cannabinoïdes sont rendus une cible importante pour le développement des traitements anti-cancéreux notamment au niveau du système nerveux central (216). Le delta<sup>9</sup>-

THC a montré des effets immunosuppresseurs dans la majorité des études, en effet il inhibe les fonctions des macrophages et des lymphocytes, il diminue la résistance aux agents infectieux et réduit la production de beaucoup de cytokines comme l'interleukine-2 (IL-2), l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interféron-gamma (INF- $\gamma$ ) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ). (216). Les 2 types de récepteurs aux cannabinoïdes, CB1 et CB2 semblent être impliqués dans l'inflammation (50).

#### **4.7.3-Effet cardioprotecteur des cannabinoïdes :**

Dans le laboratoire de Dr Lamontagne, une contribution des endocannabinoïdes dans l'effet protecteur endothélial du PCI sur des artères coronaires de rats a été suggérée (30). Nous avons confirmé par immunobuvardage (western blots) la présence des récepteurs CB1 et CB2 au niveau du tissu cardiaque de rat (29).

Nous avons également établi des séries expérimentales sur un modèle de cœurs de rats isolés démontrant un effet cardioprotecteur important des endocannabinoïdes. Cet effet protecteur était médié principalement par le récepteur CB2 et impliquait l'activation de p38, ERk1/2, et PKC (170).

Dans notre laboratoire, une autre étude sur des cœurs de rats isolés a suggéré l'implication des cannabinoïdes dans la cardioprotection des lipopolysaccharides (LPS) contre l'ischémie du myocarde et ceci principalement à travers le récepteur CB2. Ces résultats suggèrent une relation entre les cannabinoïdes et un vasodilatateur, le monoxyde d'azote (NO) (159).

### *5-Buts du travail :*

Dans le laboratoire du Dr. Lamontagne, l'effet cardioprotecteur des endocannabinoïdes était testé et démontré sur des cœurs de rats isolés et perfusés sur modèle langendorff (170). Il a été également démontré que les cannabinoïdes endogènes contribuaient à l'effet protecteur endothélial du préconditionnement ischémique au niveau des artères coronaires chez le rat (30). Les agonistes des PPARgamma, notamment les TZDs, se sont montrés cardioprotecteurs. Cette hypothèse a été démontrée dans de nombreuses études déjà citées.

Pour toutes ces raisons, nous avons voulu vérifier l'implication des PPARgamma dans la cardioprotection induite par les endocannabinoïdes et du PCI. Pour cela, nous avons effectué des séries expérimentales consistant à traiter des cœurs de rats isolés par certains cannabinoïdes, de vérifier leur effet cardioprotecteur et de procéder par la suite à l'utilisation d'un antagoniste des PPARgamma sur des cœurs de rats isolés, perfusés, et préalablement traités par un cannabinoïde. La même approche a été utilisée pour vérifier l'implication des PPARgamma dans le processus du préconditionnement ischémique (PCI). En fait, les PPARgamma ne semblaient pas contribuer primordialement à l'effet cardioprotecteur du PCI et des cannabinoïdes

D'après nos résultats (voir article), il a été nécessaire de tester l'implication des PPARalpha dans ces phénomènes de cardioprotection (PCI et cannabinoïdes) mais malheureusement le peu d'outils pharmacologiques constituait un facteur limitant dans notre étude. Cependant, nous avons voulu tester un lien entre les PPARgamma et les PPARalpha.

Dans la littérature, il a été démontré que l'activation des PPARgamma, induisait l'expression de certains gènes dont celui codant pour le récepteur CD36. Ce récepteur a été impliqué dans l'inflammation, l'athérogenèse, l'angiogenèse et la thrombose. Cependant, l'implication de ce récepteur éboueur « scavenger » dans la cardioprotection post-ischémique n'a jamais été

explorée. Pour cela, nous avons effectué des séries expérimentales testant des agonistes des PPARgamma sur des souris déficientes en CD36 (CD36<sup>-/-</sup>).

## **Chapitre II**

### Article

**Article en préparation**

**Implication des PPARgamma dans l'effet  
cardioprotecteur des endocannabinoïdes et du  
préconditionnement ischémique**

Auteurs : Dima Awad, Daniel Lamontagne  
Revue : Life Science

### Abstract

The aim of the present study was to assess the contribution of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma), a ligand-activated transcription factor belonging to the nuclear receptor superfamily in cardioprotection afforded by endocannabinoids and ischemic preconditioning (IPC). The CD36 being a scavenger receptor of which the expression is increased in response to PPARgamma activation, a relation between PPARgamma/CD36 in post-ischemic cardioprotection was investigated as well. A reduction in infarct size effect in hearts treated with Ciglitazone, a selective agonist of the PPARgamma was observed. GW9662, a selective antagonist of PPARgamma, completely abolished the cardioprotective effect of Ciglitazone. A reduction in infarct size with the endocannabinoids (2AG and PEA), with WY14643 (selective agonist of the PPARalpha) and with IPC was noted at the end of ischemia/reperfusion (I/R) protocol. Administration of GW9662 to hearts treated with 2AG, PEA, WY14643 and IPC did not abolish their post-ischemic cardioprotective effect on infarct size. In contrast, improvement in post-ischemic cardiac recovery when treatment with endocannabinoids was combined with GW9662 was observed. Similar results were observed with IPC. The ability of GW9662 to act in a PPARgamma-independent manner or as a partial agonist of PPARalpha might explain our results. The cardioprotective effect of Cig observed with WT mice was completely abolished when CD36<sup>-/-</sup> mice were treated with PPARgamma agonist. The scavenger receptor CD36 seems to play an important role in cardioprotection afforded by PPARgamma activation.

In conclusion, although pharmacological activation of PPARgamma reduces infarct size, these nuclear receptors are not involved in the infarct size-limiting effect of cannabinoids and IPC.

*Keywords: PPARgamma, PPARalpha, endocannabinoides, PCI, CD36, cardioprotection, 2AG, PEA, WY14643, GW9662, Cig, heart, rat, mice.*

## Introduction

Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma is a ligand-activated transcription factor belonging to the nuclear receptor superfamily (15, 28, 36). PPARgamma is an important therapeutic drug target against several diseases such as diabetes, inflammation, dyslipidemia, hypertension and cancer (13, 15, 28, 36). In vitro molecular studies have shown that PPARgamma can interfere with inflammatory pathways such as NF $\kappa$ B, by physically interacting with P50 and P65 (6). PPARgamma can also inhibit the AP-1 signaling pathway by interacting with c-Jun (9), as well as the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) via interaction with STAT-1, AP-1 and NF $\kappa$ B pathways (19). It was also shown that PPARgamma ligands reduce IL-2 secretion, secondary to an interaction of this nuclear receptor with the nuclear factor of activated T-cells (NFAT) (35). PPARgamma is activated by polyunsaturated acids and eicosanoids like arachidonic acid and 15deoxy. $\delta$ 12,14-prostaglandineJ2 (14, 34).

Ischemic preconditioning (IPC) is the most characterized and well known endogenous cardioprotective mechanism for its potent effects, resulting in a smaller infarct size (21), a reduced risk of ischemia/reperfusion (I/R) arrhythmias (26), improved recovery of ventricular function (7), and prevention of endothelial stunning (2). Other forms of endogenous protective mechanisms include the inflammatory response after exposure to lipopolysaccharides (LPS) (16) and heat stress

(11). We have shown that endocannabinoids (such as PEA and 2AG), which have been detected in rat cardiac tissue (23), are able to protect rat isolated hearts from I/R damages (18), and are involved in the cardioprotective effects of LPS (16), heat stress (11), and IPC (3). Pharmacological activators of PPARgamma have been shown to exert a cardioprotective effects, reducing the extent of myocardial infarction in several animal models (8, 12, 38). However,

the contribution of PPARgamma in the endogenous cardioprotective mechanisms remains unknown. Therefore, the aim of the present study was to investigate this possibility by means of treatment with endocannabinoids, which have a structural resemblance with several PPARgamma agonists, and IPC. We wanted investigated a cross-talk between PPARgamma and PPARalpha by testing the cardioprotective effects of a PPARalpha agonist (WY14643) when combined to a previous administration of PPARgamma antagonist (GW9662). Furthermore, it has been reported that CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis, inflammation, angiogenesis and thrombosis activates PPARgamma (22, 30). In addition, the PPARgamma activators, thiazolidinediones (TZDs), increase the expression of CD36 (22, 30). However, the implication of CD36 in the cardioprotection phenomena has never been studied. Therefore we have examined the ability of CD36 to interfere with cardioprotective effects of PPARgamma activation using CD36<sup>-/-</sup> mice.

## **Materials and methods:**

### ***Heart preparation:***

All experiments were performed in accordance with the guidelines from the Canadian Council on Animal Care. Male Sprague-Dawley (300-350 g) rats were narcotised with CO<sub>2</sub> until a complete loss of consciousness, rapidly decapitated, and the hearts were immediately excised and placed in ice-cold heparin-treated (10 IU ml<sup>-1</sup>) buffer. They were mounted on a Langendorff set-up and perfused at a constant flow (14 ml.min<sup>-1</sup>) by means of a digital roller pump (Masterflex, Labcor, Anjou, QC, Canada). The perfusion solution consisted of a modified Krebs–Henseleit buffer containing (in mM): 118 NaCl; 4 KCl; 2.5 CaCl<sub>2</sub>; 1.2 MgSO<sub>4</sub>; 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 24 NaHCO<sub>3</sub>; 5.0 D-glucose; and 2.0 pyruvate. The perfusate was kept at 37°C and bubbled with 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> (pH 7.4). A water-filled latex balloon attached to a pressure transducer and a recording system, was inserted into the left ventricular cavity for pressure recordings. Left ventricular end-diastolic pressure was adjusted between 10 and 15 mm Hg. Coronary perfusion pressure (CPP), heart rate (HR), left ventricular developed pressure (LVDP), and its first derivative dP/dt (rate of contraction) were continuously recorded. The flow rate was adjusted during the stabilization period to obtain a CPP of about 100 mm Hg and was held constant, with the exception of the ischemic period, during which flow was reduced to 0.4 ml min<sup>-1</sup> ensuring a constant concentration during the entire ischemic period (low flow ischemia). All drugs were administered through a Y connector above the aortic cannula with syringe pump (model 11, Harvard Apparatus, Saint-Laurent, QC, Canada) at 100% of the coronary flow rate.

A similar protocol was used with mouse hearts. Wild type (WT) and CD36<sup>-/-</sup> knock-out (KO) male C57BL/6 mice (20-25g / age : 3-4 months) were killed as described above, and the hearts perfused with a modified buffer

containing buffer (in mM): 118.5 NaCl; 4.7 KCl; 2.5 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 1.2 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.5 Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O; 25 NaHCO<sub>3</sub>; 11.1 D-glucose, at a lower flow rate (3ml.min<sup>-1</sup>). During the ischemic period, the flow was reduced to 0ml.min<sup>-1</sup> (zero-flow ischemia).

At this point it is important to mention that although the unconscious animals were decapitated before they stopped breathing, one cannot rule out the possible hypoxic-preconditioning effect following the exposure to the CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere

### *Experimental protocols:*

Rat hearts were distributed into three different groups (Figure 1). In the first group, hearts were stabilized for 35 minutes (flow rate =14 ml.min<sup>-1</sup>) then exposed to 90 minutes of ischemia (flow rate=0.4 ml.min<sup>-1</sup>) followed by 60 minutes of reperfusion. The second group was similar to the first group except that the hearts were stabilized for 20 minutes then perfused with one of the following agonists for 15 minutes: Ciglitazone (Cig), a selective agonist of PPARgamma; PEA, a cannabinomimetic drug; 2-AG, an endogenous cannabinoid or with WY14643, an agonist of PPARalpha. In a third group, hearts were stabilized for a period of 15 minutes followed by 5 minutes of perfusion with GW9662, a selective antagonist of PPARgamma. Prior to the ischemic episode, the hearts were perfused for 15 minutes with Cig, 2AG, PEA, or WY14643 (n=5-9 per group).

In the second experimental design, rat hearts were distributed into five groups. The first three groups were similar to the ones described in the first experimental design except that the treated hearts were perfused only with Cig with a previous administration or not of its antagonist (GW9662). The fourth group was stabilized for 15 minutes and exposed to one episode of IPC (5 minutes of zero flow ischemia/10 minutes reperfusion) prior to 90 minutes

ischemia/60 minutes reperfusion. The final group was similarly treated except that the hearts were stabilized for 15 minutes followed by 5 minutes of antagonist treatment (GW9662).

In a third experimental design, we wanted to test the role of the CD36 in the post-ischemic cardioprotection triggered by PPAR $\gamma$  activation. Littermates wild type and transgenic CD36 $^{-/-}$  mice were assigned to different groups (n=4), control and treated with Cig. In the first group, hearts were subjected to 30 minutes stabilization period (flow rates= 3 ml.min $^{-1}$ ) followed by 30 minutes zero-flow ischemia and to 90 min reperfusion (flow rate= 3ml.min $^{-1}$ ). In the second group, stabilization period was reduced to 15 minutes then drugs or vehicles were administered for 15 additional minutes prior to the I/R protocol.

#### ***Infarct size determination:***

Infarct size was determined at the end of each experimental protocol. Atria were removed and the ventricles was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 10 min. It was then cut into 0.6–0.8 mm transverse sections from apex to base. Once thawed, the slices were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  with 1% triphenyltetrazolium chloride in phosphate buffer (pH7.4) for 10 min and fixed in 10% formaldehyde solution to distinguish the clearly stained viable tissue from unstained necrotic tissue. Infarct size was determined using a computerised planimetric technique (Scions image for Windows) and expressed as a percentage of the total ventricular area which, in a global ischaemia, is equal to the area at risk.

***Drugs:***

Ciglitazone is a selective agonist of PPARgamma. Stock solution was prepared by dissolving 10 mg of this product in 3 ml of DMSO; the final concentration in the heart was  $10^{-7}$ M.

PEA is a cannabinomimetic. Its solution was prepared by dissolving 10 mg of PEA in 2 ml of anhydrous ethanol; the final concentration in the heart was  $3 \cdot 10^{-7}$  M.

2-AG is an endogenous cannabinoid. Its solution was prepared by dissolving 5 mg of 2-AG in 0.4 ml of anhydrous ethanol; the final concentration in the heart was  $3 \cdot 10^{-7}$  M.

GW9662 is a selective antagonist of PPARgamma. Its solution was prepared by dissolving 20 mg of GW9662 in 3 ml of anhydrous ethanol; the final concentration in the heart was  $2 \cdot 10^{-6}$  M.

WY14643 is an agonist of PPARalpha. Its solution is prepared by dissolving 20 mg of this product in 3 ml of DMSO; the final concentration in the heart was  $10^{-5}$  M. The perfusion of  $3 \mu$ M WY14643 had no significant effect on the studied parameters (data not shown).

All these products were provided by Tocris (Cedarlane laboratories-Hornby-Ontario-Canada).

Some control animals were perfused with the appropriate amounts of ethanol and DMSO (the solvents used in drug preparation). Non of the studied parameters were affected with these treatments. Moreover, treatment with GW9662 alone had no effect neither on hemodynamic parameters nor on infarct size as compared to the untreated hearts.

***Statistical analysis:***

Values represented the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of differences between means was evaluated by a two-way analysis of variance with Scheffe post-hoc test. A commercially available software (Systat® for windows® version 6.1) was used. Only probability values (p) smaller than 0.05 were considered to be statistically significant.

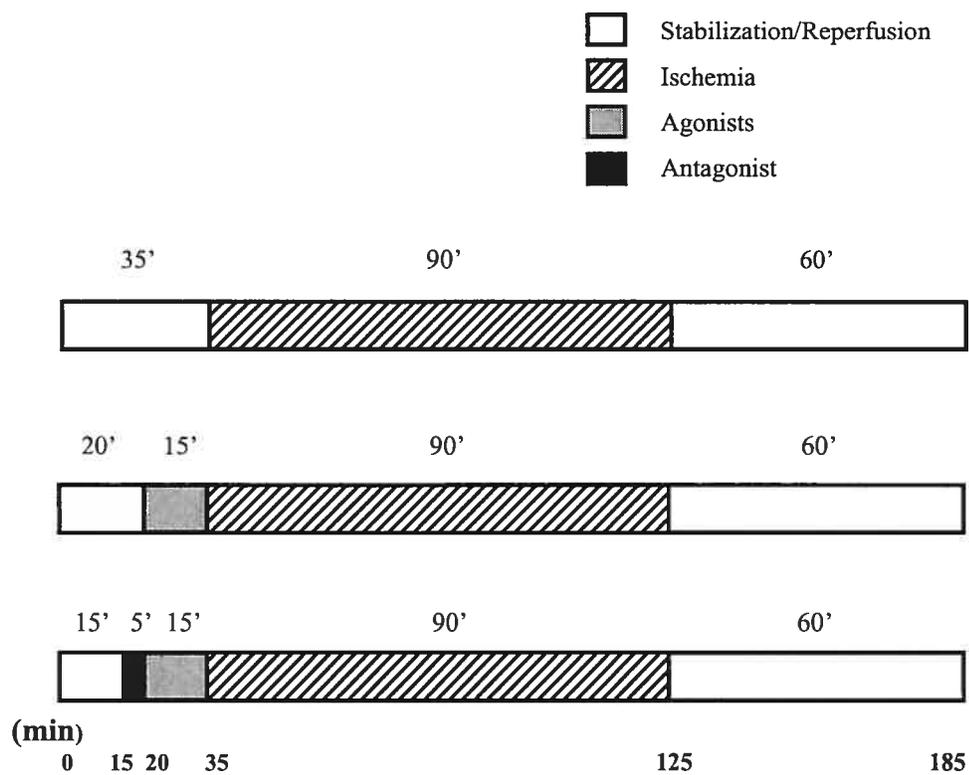


Figure 1. Schematic presentation of the first experimental design depicting hearts exposed to ischemia reperfusion with or without treatment with agonists ( $10^{-7}$ M Cig,  $3 \cdot 10^{-7}$ M 2AG,  $3 \cdot 10^{-7}$ M PEA, or  $10^{-5}$ M WY14643) and antagonist ( $2 \cdot 10^{-6}$ M GW9662).

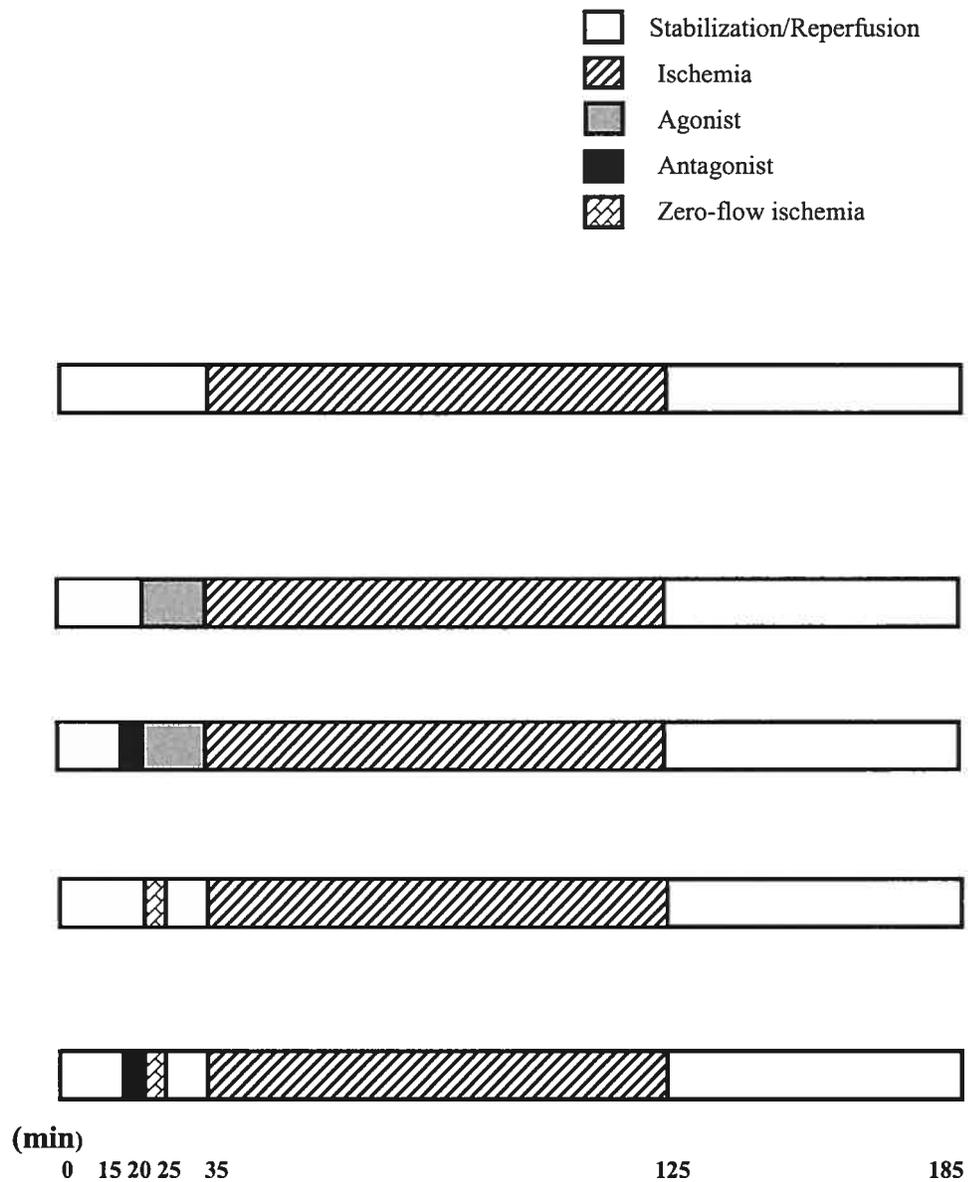


Figure 2. Schematic presentation of the second experimental design depicting hearts exposed to an episode of IPC with or without treatment with agonist ( $10^{-7}$ M Cig) and antagonist ( $2 \cdot 10^{-6}$ M GW9662).

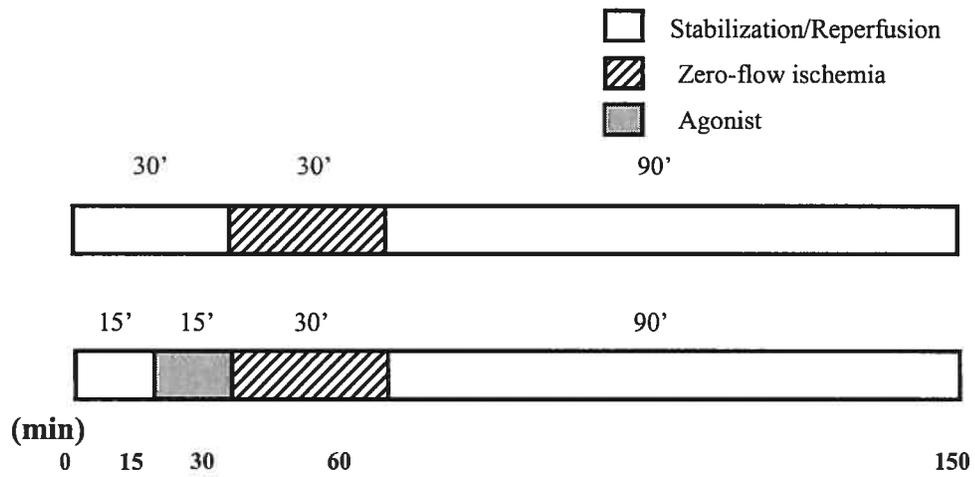


Figure 3. Schematic presentation of the third experimental design depicting hearts (WT and CD36<sup>-/-</sup> mice) exposed to I/R with or without treatment with agonist ( $10^{-7}$ M Cig).

## Results

### *Role of PPAR gamma and alpha on I/R hearts:*

Tables 1-4 show the coronary perfusion pressure (CPP), dP/dt, left ventricular developed pressure (LVDP) and heart rate (HR) levels (% of baseline values) respectively in hearts treated with and without PPARgamma agonist, antagonist and PPARalpha agonist. The administration of agonists and antagonists solvent during all protocols had no effect on the studied parameters (Data not shown). During ischemia there was a significant drop in CPP, LVDP and dP/dt levels, but not in HR, when compared to the stabilization period. CPP levels were higher in the Cig+GW (31.7%,  $p<0.05$ ) and WY (37.9%,  $p<0.05$ ) as compared to the control group (11.6%) during the ischemic episode (Table 1). During reperfusion, the CPP values were markedly elevated above the stabilization level by 37%, 59%, 30% and 10% in the control, Cig+GW, WY and WY+GW, respectively. The Cig group recovered to the stabilization levels. No statistical differences were observed between the groups at the end of the reperfusion period.

Although ischemia significantly decreased the dP/dt of all hearts (Table 2), the values in the Cig and WY groups were higher than the control. Moreover, the levels of the Cig group were higher than those of the Cig hearts treated with GW. Reperfusion did not protect the control, Cig, Cig+GW hearts against the ischemic insult but it was obviously protective to the WY and WY+GW treated hearts. Furthermore, the recovery in the WY+GW group was higher than that of the Cig+GW group ( $p<0.05$ ).

As for LVDP (Table 3), hearts either stopped beating as in the control, Cig and Cig+GW groups or were slightly but significantly beating (WY and WY+GW) as compared to the control. Reperfusion had no significant effect on

the levels of recovery except for the WY treated hearts as compared to all other groups.

Heart rate significantly dropped only in the control group (Table 4). Reperfusion did not show any significant recovery in the control group. Nevertheless, HR was augmented in the Cig+GW (to 249%), decreased in the WY+GW (to 44.6%) with no change in the WY group (118.2%). A significant difference was observed in the Cig, WY and WY+GW groups as compared to the Cig+GW group. As compared to the control group, the recovery levels in the Cig group were higher while lower in the WY+GW group.

Infarct size was high in the control group ( $48.1 \pm 9.2\%$ ) and was markedly reduced by the administration of Cig ( $14 \pm 0.8\%$ ) and WY ( $18.8 \pm 3.2\%$ , Figure 4). The administration of GW to the WY treated hearts ( $38.4 \pm 2.9\%$ ) or to the Cig. treated hearts ( $70.2 \pm 1.8\%$ ) completely abolished the protective effect observed.

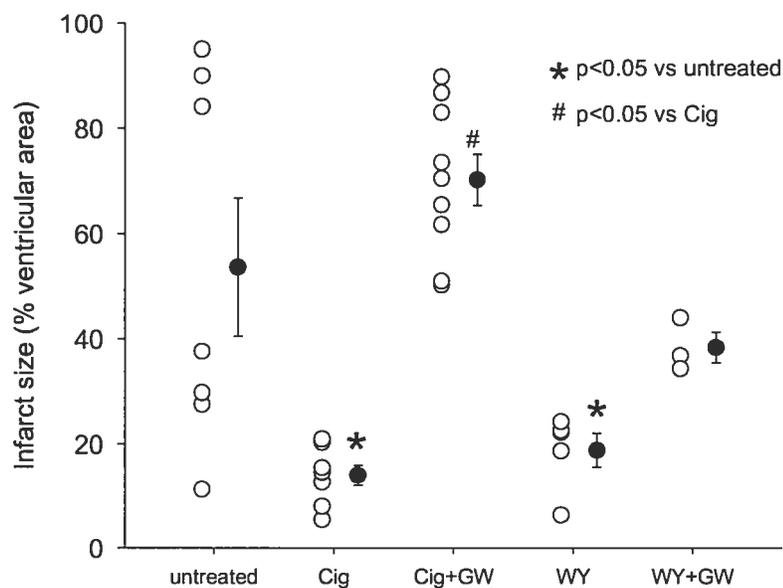


Figure 4: Effect of PPARgamma and alpha agonists and antagonist on the infarct size of I/R hearts.

***Role of cannabinoids on I/R hearts:***

Treatments used had no effect on the CPP before the beginning of the ischemic episode (Table 5). During ischemia, because of the low flow of buffer, CPP significantly decreased vs. the stabilization period in all of the experimental groups.

At the end of the protocol, CPP levels were recovered to the stabilization values in all groups except in the control and 2AG groups which were significantly augmented by 37% and 22%, respectively.

Similarly, no changes were noted in the  $dP/dt$  during stabilization and the treatment period (Table 6). The rate of contraction significantly dropped in all of the experimental groups during the ischemic period. All the groups presented a low level of recovery of 20-40% during reperfusion which was not significantly different from the stabilization period. Nevertheless, the 2AG+GW and PEA+GW groups recovered by 83.4% and 72.4% ( $p < 0.05$ ), respectively, vs the control group.

Treatments that affected the LVDP 1 min before ischemia were, PEA in combination with or without GW (decreasing to 90.1% and 91.2%, respectively, vs. stabilization) (Table 7). During the ischemic period all hearts stopped beating completely. At the end of the protocol, LVDP diminished significantly vs stabilization for all the groups except for 2AG+GW (81.3%). The combination of endocannabinoid with GW seems to ameliorate the LVDP significantly vs. control (2AG+GW, 81.3% and PEA+GW, 60.8% vs 5.0%). This phenomenon was not observed when GW was introduced in combination with Cig (1.5%). In addition, the recovery level in the 2AG+GW group was higher than that of the Cig group (table 3).

The heart rate (Table 8) was significantly diminished for all the groups during the ischemia period vs. stabilization. Both endogenous cannabinoids conferred a significant reduction of the infarct size injury (2AG,  $5.1 \pm 1.4\%$ ; PEA,  $10.4 \pm 2.3\%$ ) vs. control (figure 5). Pre-treatment of these hearts with GW9662 partially inhibited the cardioprotection observed with the endocannabinoids (2AG+GW9662,  $23.5 \pm 5.7\%$ ; PEA+GW9662,  $26.9 \pm 7.2\%$ ).

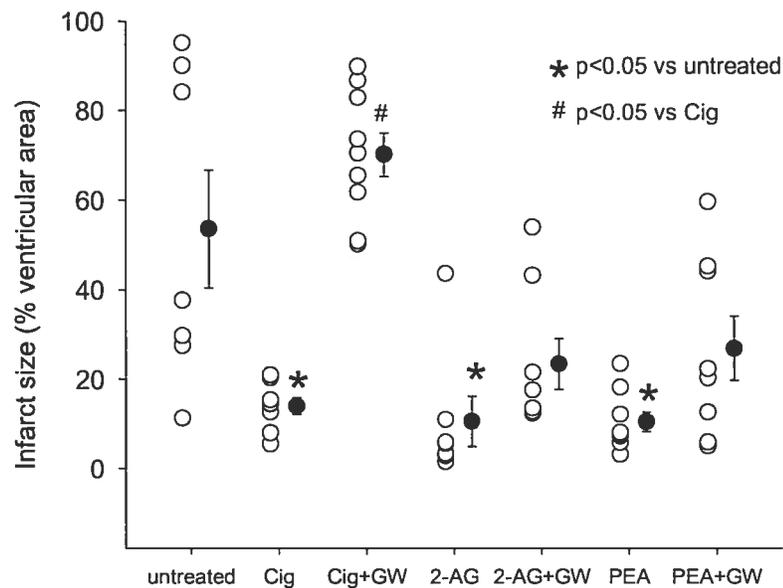


Figure 5: Effect of cannabinoids on the infarct size of I/R hearts. The first three groups (untreated, Cig, and Cig+GW9662) are reproduced from figure 4 for an easier comparison.

***Role of IPC plus PPARgamma antagonist on I/R hearts:***

IPC had no effect on the CPP during the period that preceded the ischemic phase (Table 9). The drop in CPP was observed by the end of the 90 min of ischemia in all the studied groups. At the end of the protocol, CPP seems to be significantly augmented in all groups vs. stabilization.

IPC seems to ameliorate dP/dt one minute before the severe ischemia as compared to the stabilization period (137.5%, Table 10). All hearts showed a drastic diminution in dP/dt by the end of the ischemic period. A decrease in the dP/dt was observed in all hearts by the end of the reperfusion period, this decrease was significant for all the groups as compared to the stabilization period.

LVDP was diminished just after IPC for the IPC (48.3%) and the IPC+GW9662 group (62.1%) (Table 11). This diminution was significant vs. stabilization and vs. control (105.5%). All hearts stopped beating completely during the ischemic phase. The recovery during the reperfusion period was minimal in all groups but it was significant in the IPC+GW9662 group as compared with the control group.

IPC had no effect on the HR during the whole experimental protocol even when combined with GW9662.

A significant reduction in the infarct size was observed in the IPC group ( $20.2 \pm 3.7\%$ ) vs control. Besides one outsider, treatment of IPC hearts with GW9662 did not block the protective effect observed in the IPC group (figure 6).

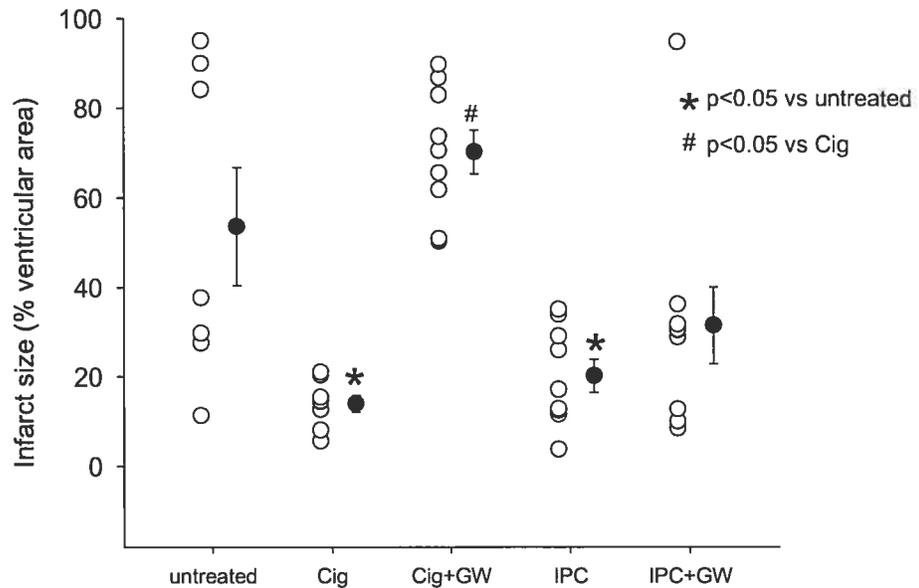


Figure 6: Effect of IPC plus PPARgamma antagonist on the infarct size of I/R hearts. The first three groups (untreated, cig, and Cig+GW9662) are reproduced from figure 4 for an easier comparison.

#### ***CD36<sup>-/-</sup> Mice:***

The infarct size of WT mice exposed to I/R was  $32.4 \pm 0.8\%$  (figure 7). The I/R protocol had a less drastic effect on the CD36<sup>-/-</sup> group ( $27.2 \pm 1.7\%$ ). Injuries were significantly reduced when WT mice were treated with Cig ( $13.4 \pm 1.3\%$ ). This cardioprotective effect was significantly reduced when CD36<sup>-/-</sup> were treated by the same concentration of Cig ( $33.2 \pm 1.3\%$ ).

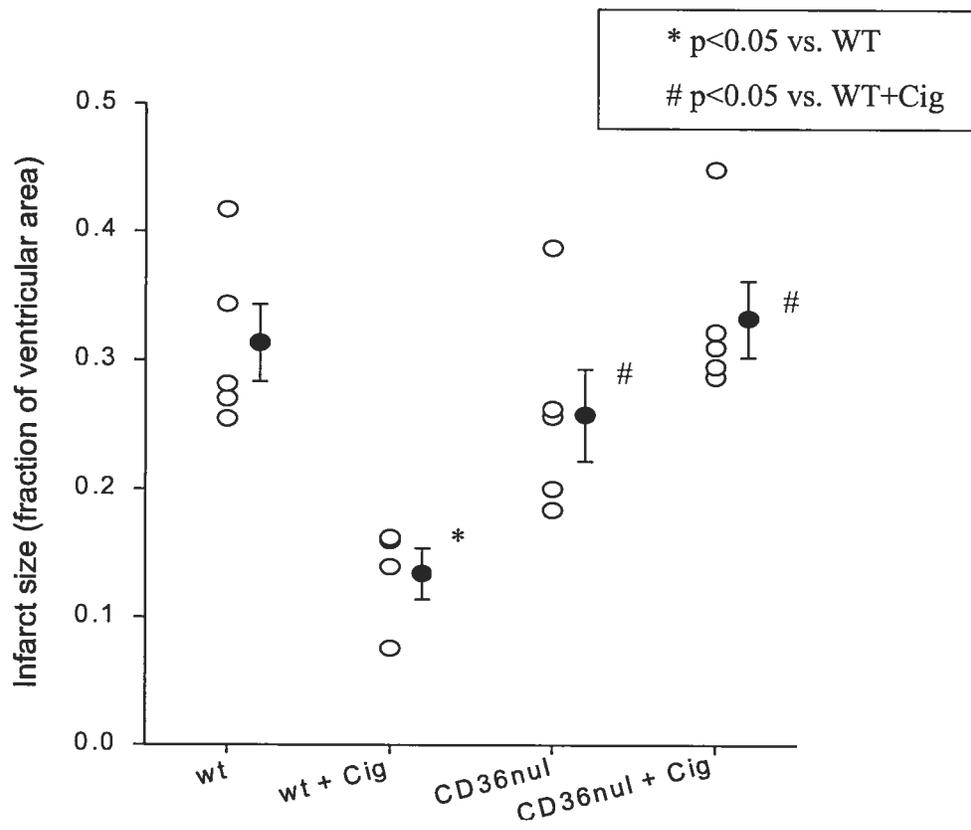


Figure 7:

Effect of Cig treatment of the CD36<sup>-/-</sup> mice on the infarct size after exposure to I/R.

Table 1: Effect of PPARgamma and PPARalpha agonists and antagonist on coronary perfusion pressure (CPP) of I/R hearts

% CPP	Stabilization	Treatment	Ischemia	Reperfusion
Control	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	11.6 ± 2.9 *	137.0 ± 3.2 *
Ciglitazone	100.0 ± 0.0	105.0 ± 3.1	24.5 ± 2.0 *	114.9 ± 11.2
Ciglitazone + GW9662	100.0 ± 0.0	115.7 ± 10.1	31.7 ± 6.9 * †	159.1 ± 17.6 *
WY14643	100.0 ± 0.0	106.2 ± 4.2	37.9 ± 3.9 * †	130.1 ± 6.3 *
WY14643 + GW9662	100.0 ± 0.0	112.0 ± 4.7	32.7 ± 4.1 *	110.3 ± 2.0 *

\*: P&lt;0.05 vs. Stabilization

†: P&lt;0.05 vs. Control

Table 2: Effect of PPARgamma and PPARalpha agonists and antagonist on left ventricular developed pressure of I/R hearts

% dP/dt	Stabilization	Treatment	Ischemia	Reperfusion
Control	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	undetectable	14.7 ± 2.2 *
Ciglitazone	100.0 ± 0.0	140.0 ± 25.8	undetectable	39.0 ± 9.4 *
Ciglitazone + GW9662	100.0 ± 0.0	123.9 ± 25.4	undetectable	19.6 ± 9.0 *
WY14643	100.0 ± 0.0	138.6 ± 20.0	13.1 ± 1.8 * †	68.2 ± 15.6 †
WY14643 +GW9662	100.0 ± 0.0	84.2 ± 16.2	9.7 ± 3.7 *	42.1 ± 11.1 † a

\*: P&lt;0.05 vs. Stabilization

†: P&lt;0.05 vs. Control

a: P&lt;0.05 vs. Ciglitazone+GW9662

Table 3: Effect of PPAR gamma and alpha agonists and antagonist on left ventricular developed pressure (LVDP) I/R hearts

%	Stabilization	Treatment	Ischemia	Reperfusion
<b>LVDP</b>				
<b>Control</b>	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 *	5.0 ± 2.5 *
<b>Ciglitazone</b>	100.0 ± 0.0	105.5 ± 6.6	0.0 ± 0.0 * b	27.7 ± 6.1 * b
<b>Ciglitazone + GW9662</b>	100.0 ± 0.0	78.3 ± 7.2 *	0.0 ± 0.0 * b	1.5 ± 4.4 * b
<b>WY14643</b>	100.0 ± 0.0	115.3 ± 10.9	7.6 ± 2.1 * †	46.1 ± 11.1 * †
<b>WY14643 + GW9662</b>	100.0 ± 0.0	67.3 ± 14.8 b	28.2 ± 10.2 * b	17.4 ± 4.7 * b

\*: P<0.05 vs. Stabilization

†: P<0.05 vs. control

b: P<0.05 vs. WY14643

Table 4: Effect of PPARgamma and alpha agonists and antagonist on heart rate of I/R hearts.

%	Stabilization	Treatment	Ischemia	Reperfusion
<b>HR</b>				
Control	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	undetectable	67.8 ± 26.7 *
<b>Ciglitazone</b>	100.0 ± 0.0	90.7 ± 9.0	undetectable	99.0 ± 0.5 † a
<b>Ciglitazone + GW9662</b>	100.0 ± 0.0	130.8 ± 25.3	undetectable	249.0 ± 36.3 † *
<b>WY14643</b>	100.0 ± 0.0	116.4 ± 9.3	77.5 ± 9.7	118.2 ± 17.7 a
<b>WY14643 + GW9662</b>	100.0 ± 0.0	84.0 ± 12	100.6 ± 16.6	44.6 ± 11.8 * † a

\*: P&lt;0.05 vs. Stabilization

†: P&lt;0.05 vs. Control

a: P&lt;0.05 vs. Ciglitazone+GW9662

Table 5: Effect of cannabinoids on coronary perfusion pressure of I/R hearts

%	Stabilization	Treatment	Ischemia	Reperfusion
<b>CPP</b>				
Control	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	11.6 ± 2.9 *	137.0 ± 3.2 *
<b>2AG</b>	100.0 ± 0.0	104.9 ± 4.9	15.5 ± 2.5 *	122.2 ± 9.0 *
<b>2AG + GW9662</b>	100.0 ± 0.0	97.8 ± 4.7	22.8 ± 2.9 *	104.6 ± 10.05
<b>PEA</b>	100.0 ± 0.0	106.0 ± 5.2	19.6 ± 3.6 *	119.7 ± 9.2
<b>PEA + GW9662</b>	100.0 ± 0.0	112.0 ± 4.7	32.7 ± 4.1 *†	110.3 ± 2.0

\*: P&lt;0.05 vs. Stabilization

†: P&lt;0.05 vs. Control

Table 6: Effect of cannabinoids on rate of contraction of I/R hearts

%	Stabilization	Treatment	Ischemia	Reperfusion
dP/dt	Control	100.0 ± 0.0	undetectable	14.7 ± 2.2 *
	2AG	98.0 ± 6.1	undetectable	33.9 ± 11.3 *
	2AG + GW9662	120.8 ± 9.5	undetectable	83.4 ± 25.0 †
	PEA	99.3 ± 4.3	undetectable	11.1 ± 7.2 *
	PEA + GW9662	98.5 ± 3.4	undetectable	72.4 ± 17.9 †

\*: P&lt;0.05 vs. Stabilization

†: P&lt;0.05 vs. Control

Table 7: Effect of cannabinoids on left ventricular developed pressure of I/R hearts

%		Stabilization	Treatment	Ischemia	Reperfusion
<b>LVDP</b>	<b>Control</b>	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 *	5.0 ± 2.5 *
	<b>2AG</b>	100.0 ± 0.0	82.3 ± 4.5	0.0 ± 0.0 *	20.0 ± 8.5 * c d
	<b>2AG + GW9662</b>	100.0 ± 0.0	100.0 ± 6.1	0.0 ± 0.0 *	81.3 ± 14.4 †
	<b>PEA</b>	100.0 ± 0.0	91.2 ± 3.5 *	0.0 ± 0.0 *	15.3 ± 4.4 * d
	<b>PEA + GW9662</b>	100.0 ± 0.0	90.1 ± 2.1 *	0.0 ± 0.0 *	60.8 ± 12.7 * †

\*: P&lt;0.05 vs. Stabilization

†: P&lt;0.05 vs. control

c : P&lt;0.05 vs. 2AG+GW9662

d: P&lt;0.05 vs. PEA+GW9662

Table 8: Effect of cannabinoids on heart rate of I/R hearts

%		Stabilization	Treatment	Ischemia	Reperfusion
HR	<b>Control</b>	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	undetectable	67.8 ± 26.7 *
	<b>2AG</b>	100.0 ± 0.0	91.4 ± 4.4	undetectable	113.0 ± 22.8
	<b>2AG + GW9662</b>	100.0 ± 0.0	114.0 ± 9.4	undetectable	112.9 ± 15.5
	<b>PEA</b>	100.0 ± 0.0	92.3 ± 6.7	undetectable	146.7 ± 20.2
	<b>PEA + GW9662</b>	100.0 ± 0.0	103.1 ± 4.0	undetectable	113.7 ± 23.9

\*: P&lt;0.05 vs. Stabilization

Table 9: Effect of cannabinoids on coronary perfusion pressure of I/R hearts

%	Stabilization	Ischemic preconditioning	Ischemia	Reperfusion
<b>CPP</b>				
Control	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	11.6 ± 2.9 *	137.0 ± 3.2 *
IPC	100.0 ± 0.0	101.1 ± 5.0	15.6 ± 1.9 *	127.9 ± 9.6 *
IPC + GW9662	100.0 ± 0.0	101.4 ± 3.3	19.5 ± 4.1 *	122.7 ± 6.4 *

\*: P&lt;0.05 vs. Stabilization

Table 10: Effect of IPC plus PPARgamma antagonist on rate of contraction of I/R hearts

	<b>%</b>	<b>Stabilization</b>	<b>Ischemic preconditioning</b>	<b>Ischemia</b>	<b>Reperfusion</b>
<b>dP/dt</b>					
<b>Control</b>		100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	undetectable	14.7 ± 2.2 *
<b>IPC</b>		100.0 ± 0.0	137.5 ± 11.2 *	undetectable	51.1 ± 16.9 *
<b>IPC + GW9662</b>		100.0 ± 0.0	84.2 ± 16.2	undetectable	42.1 ± 11.1 *

\*: P&lt;0.05 vs. Stabilization

Table 11: Effect of IPC plus PPARgamma antagonist on left ventricular developed pressure of I/R hearts

%	Stabilization	Ischemic preconditioning	Ischemia	Reperfusion
<b>LVDP</b>				
Control	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 *	5.0 ± 2.5 *
IPC	100.0 ± 0.0	48.3 ± 8.3 * † a	0.0 ± 0.0 *	12.3 ± 4.5 *
IPC + GW9662	100.0 ± 0.0	62.1 ± 9.1 * † a	0.0 ± 0.0 *	27.6 ± 7.1 * †

\*: P&lt;0.05 vs. Stabilization

†: P&lt;0.05 vs. Control

Table 12: Effect of IPC plus PPARgamma antagonist on heart rate of I/R hearts

%	Stabilization	Ischemic preconditioning	Ischemia	Reperfusion
<b>HR Control</b>	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	undetectable	67.8 ± 26.7 *
<b>IPC</b>	100.0 ± 0.0	121.3 ± 16.9	undetectable	132.6 ± 31.3
<b>IPC + GW9662</b>	100.0 ± 0.0	116.5 ± 7.2	undetectable	121.5 ± 10.9

\*: P&lt;0.05 vs. Stabilization

†: P&lt;0.05 vs. Control

## Discussion

Previous studies have investigated the independent cardioprotective effect of PPARgamma (8, 12, 38), PPARalpha (4, 27, 37), endocannabinoids (18) and IPC (3) on isolated rat heart model. In the present study we have assessed the implication of PPARgamma in the cardioprotective effect of endocannabinoids and IPC. Moreover, we also investigated the possible role of CD36 in post-ischemic cardioprotection using the CD36<sup>-/-</sup> mice. Our results indicate that: 1) the protection afforded by endocannabinoids is not mediated, or at most only partially by PPARgamma; 2) CD36 seems to play an important role in the PPARgamma-mediated post-ischemic cardioprotection observed in the isolated mouse heart.

In agreement with previous studies (8, 38), we have shown that Cig has cardioprotective effects in isolated rat heart. These effects were completely abolished when GW9662, an irreversible antagonist of PPARgamma, was administered during the stabilization period. The reduced ischemic lesions observed in the endocannabinoids were only partially inhibited with GW9662 pre-treatment. These results may implicate a modest contribution of PPARgamma in the protection conferred by the endocannabinoids.

Several studies demonstrated the ability of PPARalpha activation in protecting the heart from I/R injury (4, 27, 37). We wanted to further examine a potential link between PPARgamma and PPARalpha. Our results showed a significant diminution of the cardioprotective effects observed with WY14643 when these hearts were pre-treated with GW9662. WY14643, at the concentration used in this study (10  $\mu$ M) should act as a selective agonist of PPARalpha. Nevertheless, it cannot be ruled out that WY14643 might slightly bind to PPARgamma (EC<sub>50</sub> values are 0.63, 32 and >100  $\mu$ M of PPARalpha, PPARgamma and PPARdelta, respectively). This cross binding between the

receptors and their agonists and antagonists could be verified if a selective irreversible PPARalpha antagonist was commercially available. PPARalpha-/- mice would also be a good model to investigate the possible effects of GW9662. At this point it is important to mention that GW9662 has been reported to act in a PPARgamma-independent manner (25). Seargent and al. (2004) found that GW9662 can inhibit the PPARgamma activity prompted by rosiglitazone (25). Although the latter had an anticancer effect, treatment with GW9662 further enhanced this effect which suggested a possible facilitating effect of GW9662 on the PPARgamma agonist via a yet unknown pathway. From their study and ours, this effect is dependent on the presence of an activator since perfusion of isolated rat hearts with GW9662 alone had no effect on the hemodynamic parameters or the infarct size (data not shown).

Endocannabinoids used (PEA and 2AG), and IPC slightly ameliorated the functional activity of the heart although it was not statistically significant. The coronary resistance was diminished, not to a significant level, in these groups when compared to the control group. This might be a consequence of vasodilatation usually observed with endocannabinoids and IPC (2, 3, 10). Surprisingly, the hemodynamic parameters were further improved when treatment with endocannabinoids was combined with GW9662. These findings are in agreement with the anticancer effect observed with GW9662 (Ref, discussed above). It has been shown that the anti-inflammatory effect of PEA is mediated by PPARalpha (32). It was also suggested that GW9662 can act as a partial agonist of PPARalpha (17). It would be interesting to study the effect of GW9662 on the PPARalpha-/- mice in the presence and absence of PEA. This experiment would be important to investigate if the GW9662-mediated protection is solely intervened by the PPARgamma receptors and not via an interference with the PPARalpha. It is known that p38 MAPKinase and PKA can phosphorylate PPARalpha resulting in an increased transcriptional activity, whereas PPARgamma phosphorylation by ERK1/2 and JNK is associated with

a decreased transcriptional activity (1). Therefore, it would be essential to study MAPK phosphorylation in this model.

We have also noted some interesting results concerning the stability of the heart rate; which was obvious in the Cig, WY14643, 2AG, PEA, and IPC groups. Again, GW9662 has ameliorated heart stability for these groups, except for Cig. Moreover, slight bradycardia was observed when hearts were treated with a combination of GW9662 and WY14643.

Our results show that there is no correlation between hemodynamic parameters measured and ischemic injuries observed in all cases. Some treatments might act as anti-inflammatory agents, resulting in a smaller infarct size without affecting heart recovery, and some might even have the opposite effects.

Our experiments investigating the link between CD36 and PPARgamma in post-ischemic cardioprotection showed interesting results. WT mice treated with Cig showed a smaller infarct size as compared to the non-treated counterparts when exposed to the I/R protocol. CD36<sup>-/-</sup> mice showed no difference in the infarct size when compared to the WT mice, indicating that CD36 does not contribute to the injury induced by I/R. When these hearts were pre-treated with Cig, no protection was observed. These results imply that the presence of CD36 is essential for PPARgamma-mediated cardiac protection observed. Further studies are required to investigate the signaling pathway involved.

In the present study, a model of low-flow ischemia was used. This model has the advantage of allowing a continuous perfusion of cannabinoids in the ischemic myocardium, ensuring a constant concentration during the entire ischemic period. This would not have been possible in the zero-flow ischemia or regional ischemia models following coronary artery ligation. On the other hand, a zero flow ischemia model was used on isolated mouse heart to enhance the ischemic effect. At this point it is important to mention that although the unconscious animals were decapitated before they stopped breathing, one

cannot rule out the possible hypoxic-preconditioning effect following the exposure to the CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere. However, alternative methods of anesthesia have limitations of their own, since several anesthetic agents including narcotics (24), barbiturates (20), ketamine-xylazine (33), and volatile anesthetics (5, 29) can either reduce infarct size or interfere with the cardioprotective mechanisms. The time period required to excise the heart and hang it on the Langendorff apparatus was limited to 30-60 sec to reduce the possibility of preconditioning (31).

### *Conclusion*

Although pharmacological activation of PPARgamma can drastically reduce infarct size, these nuclear receptors are not involved in the cardioprotective effect of IPC, but they may be partially involved in the cardioprotective effect of cannabinoids. The role of PPARalpha remains to be established.

In addition, CD36 seems to play an important role in cardioprotection afforded by PPARgamma activation. Additional work is necessary to provide further evidence for the direct causal link between PPARgamma and CD36 in post-ischemic cardioprotection.

### References

1. BLANQUART C, BARBIER O, FRUCHART JC, STAELS B, GLINEUR C. **Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation.** *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;85(2-5):267-73.
2. BOUCHARD JF, LAMONTAGNE D. **Mechanisms of protection afforded by preconditioning to endothelial function against ischemic injury.** *Am J Physiol.* 1996;271(5 Pt 2):H1801-6.
3. BOUCHARD JF, LEPICIER P, LAMONTAGNE D. **Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart.** *Life Sci.* 2003;72(16):1859-1870
4. BULHAK A, SJOQUIST PO, PERNOW J. **Activation of PPAR-alpha protects the myocardium from ischaemia-reperfusion injury: Involvement of nitric oxide.** *Cardiovasc J S Afr.* 2004;15(4 Suppl 1):S11-S12.
5. CASON BA, GAMPERL AK, SLOCUM RE & HICKEY RF. **Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits.** *Anesthesiology.* 1997 ;87 : 1182 – 1190.
6. CHUNG SW, KANG BY, KIM SH, PAK YK, CHO D, TRINCHIERI G, KIM TS. **Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B.** *J. Biol. Chem.* 2000;275(42) :32681–32687.

7. COHEN MV, LIU GS, DOWNEY JM. **Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits.** *Circulation.* 1991;84:341-349.

8. CUZZOCREA S. **Peroxisome proliferator-activated receptors gamma ligands and ischemia and reperfusion injury.** *Vascul Pharmacol.* 2004;41(6):187-195.

9. DELERIVE P, DE BOSSCHER K, BESNARD S, VANDEN BERGHE W, PETERS JM, GONZALEZ FJ, FRUCHART JC, TEDGUI A, HAEGEMAN G, STAELS B. **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1.** *J Biol Chem.* 1999;274(45):32048-3254.

10. FORD WR, HONAN SA, WHITE R, HILEY CR. **Evidence of a novel site mediating anandamide-induced negative inotropic and coronary vasodilator responses in rat isolated hearts.** *Br J Pharmacol.* 2002;135(5):1191-1198.

11. JOYEUX M, ARNAUD C, GODIN-RIBUOT D, DEMENGE P, LAMONTAGNE D, RIBUOT C. **Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts.** *Cardiovascular Research.* 2002;55:619.

12. KHANDOUDI N, DELERIVE P, BERREBI-BERTRAND I, BUCKINGHAM RE, STAELS B, BRIL A. **Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, inhibits the Jun NH(2)-terminal kinase/activating protein 1 pathway and protects the heart from ischemia/reperfusion injury.** *Diabetes.* 2002;51(5):1507-1514.

13.KIM Y, SUH N, SPORN M, REED JC. **An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis.** *J Biol Chem.* 2002;277(25):22320-22329.

14.KLIEWER SA, SUNDSETH SS, JONES SA, BROWN PJ, WISELY GB, KOBLE C, DEVCHAND P. WAHLI W, WILLSON TM, LENHARD JM, LEHMANN JM. **Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma.** *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1997;94:4318-4323

15.KNOUFF C, AUWERX J. **Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology.** *Endocr Rev.* 2004;25(6):899-918.

16.LAGNEUX C, LAMONTAGNE D. **Involvement of cannabinoids in the cardioprotection induced by lipopolysaccharide.** *British Journal of Pharmacology.* 2001;132:793-796.

17.LEESNITZER LM, PARKS DJ, BLEDSOE RK, COBB JE, COLLINS JL, CONSLER TG, DAVIS RG, HULL-RYDE EA, LENHARD JM, PATEL L, PLUNKET KD, SHENK JL, STIMMEL JB, THERAPONTOS C, WILLSON TM, BLANCHARD SG. **Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662.** *Biochemistry.* 2002;41(21):6640-6650.

18.LEPICIER P, BOUCHARD JF, LAGNEUX C, LAMONTAGNE D. **Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia.** *Br J Pharmacol.* 2003;139(4):805-815.

19.LI M, PASCUAL G, GLASS CK. **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene.** *Mol. Cell. Biol.* 2000;20(13):4699–4707.

20.MINATOGUCHI S, KARIYA T, UNO Y, ARAI M, OHNO M, HASHIMOTO K, NISHIDA Y, WO DJ & FUJIWARA H. **Modulation of cardiac interstitial noradrenaline levels through K(ATP) channels during ischemic preconditioning in rabbits:comparison of the effect of anesthesia between pentobarbital and ketamine+xylazine.** *Heart Vessels.* 1997;12 :294–299.

21.MURRY CE, JENNINGS RB, REIMER KA. **Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.** *Circulation* 1986;74:1124–1136.

22.NAGY L, TONTONNOZ P, ALVAREZ JGA, CHEN H, EVANS RM. **Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma.** *Cell.* 1995;83:813-819.

23.SCHMID PC, SCHWARTZ KD, SMITH CN, KREBSBACH RJ, BERDYSHEV EV & SCHMID HH. **A sensitive endocannabinoid assay. The simultaneous analysis of N-acylethanolamines and 2-monoacylglycerols.** *Chem. Phys. Lipids.* 2000 ;104 ;185 – 191.

24.SCHULTZ JJ, HSU AK & GROSS GJ. **Ischemic preconditioning and morphineinduced cardioprotection involve the delta (delta)-opioid receptor in the intact rat heart.** *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997 ;29 :2187 – 2195.

25.SEARGENT JM, YATES EA, GILL JH. **GW9662, a potent antagonist of PPARgamma, inhibits growth of breast tumour cells and promotes the**

**anticancer effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone, independently of PPARgamma activation.** *Br J Pharmacol.* 2004;143(8):933-937.

26. SHIKI K, HEARSE DJ. **Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion-induced arrhythmias.** *American Journal of Physiology.* 1987;253:H1470-H1476.

27. TABERNERO A, SCHOONJANS K, JESEL L, CARPUSCA I, AUWERX J, ANDRIANTSITOHAINA R. **Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against myocardial ischaemic injury and improves endothelial vasodilatation.** *BMC Pharmacol.* 2002;2(1):10.

28. THEOCHARIS S, MARGELI A, VIELH P, KOURAKLIS G. **Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands as cell-cycle modulators.** *Cancer Treat Rev.* 2004;30(6):545-54.

29. TOLLER WG, KERSTEN JR, PAGEL PS, HETTRICK DA & WARLTIER DC. **Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs.** *Anesthesiology.* 1999 ;91:1437-1446.

30. TONTONOZ P, NAGY L, ALVAREZ J, THOMAZY VA, EVANS RM. **PPARg promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL.** *Cell.* 1998;93:241- 252.

31. VEGH A, KOMORI S, PAPP JG, SZEKERES L, PARRATT JR. **Antiarrhythmic effect of preconditioning in anesthetised dogs and rats.** *Cardiovasc Res.* 1992;26:487-92.

32. VERME JL, FU J, ASTARITA G, LA RANA G, RUSSO R, CALIGNANO A, PIOMELLI D. **The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide.** *Mol Pharmacol.* 2005;67(1):15-19.
33. WALSH RS, TSUCHIDA A, DALY JJF, THORNTON JD, COHEN MV & DOWNEY JM. **Ketamine – xylazine anaesthesia permits a KATP channel antagonist to attenuate preconditioning in rabbit myocardium.** *Cardiovasc. Res.* 1994 ;28:1337–1341.
34. XU HE, LAMBERT MH, MONTANA VG, PARKS DJ, BLANCHARD SG, BROWN PJ, STERNBATCH DD, LEHMANN JM, WISELY GB, WILLSON TM, KLIEWER SA, MILBURN MV. **Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors.** *Mol. Cell.* 1999;3:397-403.
35. YANG XY, WANG LH, CHEN T, HODGE DR, RESAU JH, DASILVA L, W.L. FARRAR WL. **Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT.** *J. Biol. Chem.* 2000;275(7):4541–4544.
36. YKI-JARVINEN H. **Thiazolidinediones.** *N Engl J Med.* 2004;351(11):1106-1118.
37. YUE TL, BAO W, JUCKER BM, GU JL, ROMANIC AM, BROWN PJ, CUI J, THUDIUM DT, BOYCE R, BURNS-KURTIS CL, MIRABILE RC, ARAVINDHAN K, OHLSTEIN EH. **Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha protects the heart from ischemia/reperfusion injury.** *Circulation.* 2003;108(19):2393-2399.

38. YUE TL. **Cardioprotective effects of thiazolidinediones, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists.** *Drugs Today (Barc)*. 2003;39(12):949-960.

# **Chapitre III**

Discussion et conclusion

## *Discussion*

Les constatations les plus importantes que nous avons pu remarquer dans notre étude effectuée étaient que le 2 AG et le PEA peuvent induire une vasodilatation coronaire, une diminution des lésions cardiaques post-ischémiques, une bonne stabilité de la fréquence cardiaque et une récupération de la contractilité cardiaque fortement améliorée en utilisant des combinaisons de traitements d'un cannabinoïde et d'un antagoniste irréversible des PPAR gamma, le GW9662 (310). Nous avons pu également constater que l'utilisation d'un agoniste des PPAR alpha sélectif à la dose utilisée diminuait les lésions cardiaques post-ischémiques (le GW9662 a pu partiellement inhiber cet effet protecteur), induisait une vasodilatation coronaire accentuée par l'utilisation du GW9662, induisait une bradycardie à la fin de la reperfusion accentuée par l'utilisation du GW9662, améliorait la récupération de la contractilité cardiaque (pas de différence significative entre le groupe WY14643 et WY14643+GW9662). Le préconditionnement ischémique a pu diminuer les lésions post-ischémiques, diminuer très légèrement la pression de perfusion coronaire (pas de différence significative entre le groupe préconditionnement ischémique (PCI) et le groupe PCI+GW9662), améliorer très légèrement la contractilité cardiaque (amélioration légèrement accentuée par l'utilisation du GW9662), préserver une certaine stabilité de la fréquence cardiaque (amélioration légère suite à l'utilisation du GW992 en combinaison avec le PCI). L'inhibition partielle de la diminution des lésions post-ischémiques observée lors de la combinaison des cannabinoïdes avec le GW9662 nous a fait penser à l'implication partielle possible des PPARgamma dans ce mécanisme de cardioprotection. Les effets des agents cardioprotecteurs sur la plupart des paramètres hémodynamiques s'amélioraient en combinant ces agents à un antagoniste sélectif et irréversible des PPAR gamma. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le GW9662 pourrait agir par un mécanisme d'action améliorant la

récupération cardiaque en activant une voie indépendante des PPAR gamma, cette voie n'est activée qu'en présence d'un substrat probablement agoniste des PPAR alpha (le GW9662 utilisé seul n'avait pas d'effet sur les mesures hémodynamiques ni sur les lésions cardiaques post-ischémiques). Cette constatation nous mène à penser à une voie indépendante des PPAR gamma impliquée dans ce phénomène de cardioprotection, peut-être même une voie inhibitrice de la dégradation des PPAR alpha est activée par le GW9662 comme la voie des MAPK. Seargent et coll. ont pu démontrer que le GW9662 pourrait inhiber la multiplication des cellules tumorales du sein pour promouvoir un effet anticancéreux d'un agoniste des PPAR gamma (la rosiglitazone) et ceci par une voie indépendante de l'activation des PPAR gamma (245). Palakhurthi et coll. avaient suggéré que l'activation des PPAR gamma n'était pas impliquée dans l'inhibition de la survie et de la multiplication cellulaire induite par plusieurs agonistes des PPAR gamma sur des cellules souches embryonnaires PPARgamma<sup>-/-</sup> (245). En plus, l'apoptose induite par le 15-deoxy12,14prostaglandine j<sub>2</sub>, un ligand agoniste des PPAR gamma semblait être indépendante de l'activation des PPARgamma (48). Perez-ortiz et coll. ont fait une étude sur des cellules de glioma et ont pu montrer également une inhibition de la survie cellulaire par des mécanismes indépendants des PPARgamma. Cette étude avait suggéré que les résultats observés sont le résultat d'une perte du potentiel membranaire mitochondrial et de la production des espèces réactives d'oxygène (radicaux libres) (245). Il semble également que les ligands des PPARgamma peuvent altérer le stockage intracellulaire de calcium (245). Cependant, l'analyse de nos résultats concernant les lésions cardiaques observées suite à l'ischémie/reperfusion nous a montré que l'effet cardioprotecteur exercé par la ciglitazone sur la taille de l'infarctus a été complètement aboli par le GW9662. Ce même effet cardioprotecteur diminuant la taille des liaisons ischémiques a été observé pour le WY14643 et le préconditionnement ischémique et a été partiellement diminué en utilisant le GW9662. Le fait qu'un antagoniste sélectif des PPARgamma (GW9662) a pu

inhiber partiellement les effets d'un agoniste des PPARalpha (WY14643) nous a poussé à réfléchir à des interactions croisées probables entre PPARalpha et PPARgamma. L'hypothèse que le GW9662 pourrait avoir un faible effet antagoniste des PPARalpha n'était pas probable du fait qu'un effet agoniste partiel des PPARalpha a été attribué au GW9662 (167). Ces résultats nous montrent également qu'il n'y a pas toujours une corrélation entre les paramètres hémodynamiques mesurés et la taille de l'infarctus observée suite à un protocole utilisé et bien déterminé. Ainsi certains agonistes peuvent améliorer la récupération des fonctions cardiaques sans affecter le degré de lésions cardiaques post-ischémiques ou vice versa.

### *Taille de l'infarctus : Mesure des lésions post-ischémiques :*

#### *1-Glitazones :*

D'après nos expériences, nous avons pu constater que la ciglitazone, un agoniste sélectif des PPARgamma pouvait diminuer d'une façon très significative les lésions cardiaques post-ischémiques. Ces résultats ne faisaient que confirmer la plupart de ceux retrouvés dans la littérature (59, 146, 201, 228, 266, 301, 301, 269, 305). Beaucoup d'études sur différents modèles animaux ont été faites pour tester l'effet anti-inflammatoire des PPARgamma, citons celle utilisant le modèle de la souris présentant une maladie intestinale inflammatoire. Une diminution de l'inflammation intestinale a été observée suite à l'utilisation d'un agoniste des PPARgamma. Ceci montre un effet anti-inflammatoire important noté suite à l'activation des PPARgamma (260). En effet, les PPARgamma semblent interférer dans beaucoup de voies inflammatoires comme pour celles impliquant le NF $\kappa$ B (47) ou la AP-1 (61). De plus, les glitazones inhibent l'expression de iNOS (176) et réduisent la sécrétion de IL-2 en interagissant avec le NFAT (299). Néanmoins, Thieringer et coll. ont pu démontrer que les glitazones n'affectaient pas l'induction LPS-dépendante de IL-6 ni l'expression de TNFalpha. Ils ont utilisé un modèle de souris -/-. Ils ont également démontré que les glitazones n'avaient pas d'effets

sur la sécrétion de certaines cytokines au niveau des monocytes et des macrophages (270).

Dans notre étude, la diminution des lésions cardiaques post-ischémiques a été complètement abolie par l'utilisation du GW9662. Ces résultats ne font qu'affirmer la sélectivité de l'antagonisme du GW9662 vis à vis des récepteurs PPARgamma (266).

Les TZDs sont utilisés pour traiter des diabétiques de type II qui présentent pour la plupart des cas de maladies cardiovasculaires. Pour cela, le besoin de faire des études concernant l'efficacité de ces molécules sur les maladies cardiovasculaires ainsi que leurs effets indésirables et secondaires presse. Jusqu'à présent, les TZDs commercialisées ne sont considérées que des molécules alternatives, dispendieuses, et à efficacité modérée en comparaison avec les thérapies hypoglycémiantes préexistantes (biguanides, inhibiteurs des alpha-glucosidases, sulfonylurées, glinides).

### ***2-Cannabinoïdes :***

Toutes les recherches faites jusqu'à présent concernant les endocannabinoïdes cherchaient surtout leurs effets cardiovasculaires à travers leurs récepteurs membranaires CB1 et CB2. Ainsi l'antagonisme du récepteur CB2 a pu empêcher la réduction des lésions cardiaques suite à une exposition à des lipopolysaccharides (LPS) (159). L'effet du récepteur CB2 sur la taille de l'infarctus suite à un choc thermique a été également étudié (140). Lépicier et coll. ont pu démontrer en travaillant sur un modèle de cœur de rat isolé que les endocannabinoïdes exerçaient bien un effet cardioprotecteur direct suite à une ischémie/reperfusion (170).

Vu la similitude structurale entre certains agonistes des PPARgamma et les endocannabinoïdes nous avons trouvé intéressant de chercher une implication des PPARgamma dans la cardioprotection post-ischémique observée suite à l'administration d'un cannabinoïde. Pour cela nous avons établi des protocoles expérimentaux utilisant le GW9662 comme antagoniste

sélectif et irréversible des PPARgamma. La concentration du GW9662 n'a pas dépassé  $10\mu\text{M}$  par risque d'antagoniser les PPARdelta (310). L'effet cardioprotecteur des cannabinoïdes observé dans notre étude rejoint la plupart des résultats cités dans la littérature. L'utilisation du GW9662 ne faisait que renverser partiellement la diminution des lésions cardiaques suite à l'ischémie/reperfusion observée avec les cannabinoïdes. Les PPARgamma ne semblaient pas contribuer d'une façon unique ou primordiale à cet effet anti-ischémique. Il est bien connu que les cannabinoïdes après activation des récepteurs CB1 et CB2 entraînent une augmentation de la phosphorylation des MAPK (170), or la phosphorylation des PPARgamma par les MAPK (ERK1/2 et JUN) conduit à leur inactivation, tandis que la phosphorylation des PPARalpha par les MAPK (p38 MAPK et PKA) conduit à leur activation (11). En plus, plusieurs études (y compris la nôtre) ont montré que l'activation des PPARalpha protégeait le cœur contre les endommagements suite à une ischémie/reperfusion. Pour ces raisons, nous nous sommes intéressés à chercher une relation entre les PPARalpha et les cannabinoïdes. Nous avons ainsi établi des séries expérimentales pour tester d'une part l'effet cardioprotecteur des PPARalpha et d'une autre part tester la présence d'une interaction croisée probable entre PPARalpha et PPARgamma.

### ***3-Fibrates :***

Nos résultats ont bien démontré que l'activation des PPARalpha induit un phénomène de cardioprotection suite à une ischémie/reperfusion sévère. Nos résultats concordent avec ceux retrouvés dans la littérature (264, 304). L'utilisation de la combinaison WY14643+GW9662 (en tenant compte des concentrations respectives de ces deux agents pour ne pas activer les autres PPARs) s'est montrée intéressante. Nous avons pu voir une réduction de l'effet du WY14643 en terme de diminution des lésions ischémiques. Cette diminution de l'effet anti-inflammatoire nous a poussé à parler d'interaction croisée entre PPARgamma et PPARalpha. Ces résultats sont préliminaires. D'autres

expériences sont nécessaires pour confirmer ou non cette hypothèse. Les expériences prévues pour l'avenir utiliseront des souris knock-out PPARalpha-/- non seulement pour étudier ce type de d'interactions croisées mais pour vérifier si l'effet cardioprotecteur des cannabinoïdes est médié par l'activation des PPARalpha.

#### ***4-Préconditionnement ischémique :***

Nous avons également voulu tester un lien entre le PCI et les PPARgamma. Dans notre laboratoire, un lien a déjà été établi entre le PCI et les cannabinoïdes (30). En effet, les cannabinoïdes semblaient augmenter l'effet protecteur endothélial du PCI. Le modèle utilisé était le modèle de cœurs de rats isolés montés sur Langendorff. Nous avons pensé que si la diminution des lésions ischémiques après injection de cannabinoïdes au niveau du cœur est liée à une activation des PPARs, peut être que ce même effet de protection observé suite à un PCI est lié également à ces récepteurs nucléaires. Pour cela, nous avons effectué des séries expérimentales testant d'une part l'effet cardioprotecteur du PCI et d'autre part l'effet d'un antagoniste des PPARgamma le GW9662 juste avant les 5 minutes du PCI. Une diminution des lésions cardiaques a été observée dans le groupe qui avait subi un PCI, ceci ne faisait que confirmer l'effet cardioprotecteur longtemps attribué au PCI. Cependant, l'absence d'inhibition de cet effet cardioprotecteur du PCI par le GW9662 ne nous permet pas de conclure à une contribution des PPARgamma. Pousser nos études sur des souris PPARalpha-/- semble être primordial afin d'avoir des résultats concluants surtout qu'il y a absence d'un antagoniste sélectif et irréversible des PPARalpha.

#### ***5-Le récepteur éboueur CD36 :***

L'activation des PPARgamma peut conduire à la transrepression ou à la transactivation d'une multitude de gènes. Parmi ces gènes citons le récepteur CD36, un récepteur éboueur impliqué dans l'athérosclérose. Les agonistes des

PPARgamma peuvent induire une augmentation de l'expression du récepteur CD36 (40, 109). Tontonoz et al ont pu démontrer que le traitement par rosiglitazone et LG268 (agoniste des RXR) a conduit à une augmentation importante de la liaison et de la capture des LDL oxydées par les macrophages THP-1 (275). En revanche, Moore et coll. (2001) et Chawla et coll. (2001) ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative de la capture des LDL oxydées ou de l'accumulation du cholestérol dans les cellules traitées par TZDs (44). Ces résultats discordants peuvent être dus à la lignée cellulaire utilisée et au temps d'incubation des cellules avec le ligand. L'effet inductif des PPARgamma sur les récepteurs CD36 peut être compensé par un effet des ligands des PPARgamma sur les récepteurs SR-A. Plusieurs études ont évalué les effets des TZDs sur le développement de l'athérosclérose, citons celle de Li et al 2000 (171). En revanche, le rôle de ce récepteur dans la cardioprotection cardiaque suite à un infarctus n'a jamais été exploré.

Nous nous sommes intéressés à étudier la relation PPARgamma – CD36 dans la cardioprotection post-ischémique dans un modèle de souris transgéniques déficientes en CD36 (CD36<sup>-/-</sup>). Nous avons ainsi effectué des séries expérimentales utilisant la ciglitazone comme agoniste sélectif des PPARgamma sur deux groupes de souris : WT et CD36<sup>-/-</sup>.

D'après nos résultats, nous avons pu constater un effet cardioprotecteur chez les souris WT traitées par la ciglitazone, cet effet diminuait significativement en injectant ce même agoniste à des souris CD36<sup>-/-</sup>. La question qui nous intriguait le plus était la suivante : *comment le récepteur CD36 a pu affecter l'effet cardioprotecteur en absence d'un ligand exogène et endogène de ce récepteur scavenger surtout que nous travaillons sur un modèle de cœurs isolés?*

En étudiant de près le mécanisme d'action des récepteurs PPARgamma et CD36 nous avons pu émettre une hypothèse. L'activateur du récepteur CD36 paraissait d'origine intracellulaire. En effet, l'activation des PPARgamma stimule l'efflux du cholestérol des cellules en induisant l'expression du

LXRalpha qui à son tour active l'expression de ABCA1, de l'apolipoprotéine E et d'autres gènes impliqués dans l'efflux du cholestérol (44, 46). Une étude faite en Espagne a pu démontrer que le récepteur CD36 avait une grande affinité pour les lipoprotéines HDL, LDL et VLDL (40). Bien que le mécanisme par lequel les HDL peuvent altérer les voies de signalisation cellulaires n'est pas bien défini, plusieurs études suggèrent que les HDL peuvent activer la voie de signalisation des MAPK, la phosphorylation des PPARgamma et l'inhibition de l'expression du récepteur CD36 en stimulant l'efflux du cholestérol (44). Selon nos résultats, le récepteur CD36 semblait jouer un rôle important dans la cardioprotection post-ischémique. D'autres expériences sont nécessaires pour plus d'évaluation notamment sur des souris transgéniques CD36<sup>-/-</sup> et WT traitées préalablement par une hormone de croissance (growth hormone released peptide GHRP).

### *Les paramètres hémodynamiques*

Nous nous sommes surtout intéressés à la fin de la période de reperfusion, donc à la fin du protocole pour évaluer les effets des traitements utilisés. En fait, la période de reperfusion est celle qui reflète la récupération cardiaque.

#### *1-La pression de perfusion coronaire :*

A la fin de nos expériences, des changements de la CPP (pression de perfusion coronaire) sont observés. La faible diminution de la CPP chez les groupes traités par la ciglitazone seule, cannabinoïdes±GW9662, WY14643±GW9662, ou ayant subi un PCI avec ou sans traitement préalable par le GW9662 reflète une diminution de la résistance coronaire donc un effet léger vasodilatateur coronaire de ces agents. Ces résultats semblent concorder avec la plupart des études retrouvées dans la littérature (29, 30, 35, 83, 87, 126, 158, 170). L'augmentation importante de la CPP pour le groupe utilisant une combinaison de traitement GW9662 et de ciglitazone pourrait refléter un degré

d'endommagement important du tissu cardiaque. Le GW9662 semble agir par la voie des PPARgamma en présence d'un agoniste sélectif des PPARgamma, il a ainsi aboli complètement l'effet vasodilatateur de la ciglitazone, tandis qu'il semble agir par un effet indépendant des PPARgamma en présence d'autres traitements pas sélectifs de ces récepteurs (PEA±GW9662, 2-AG±GW9662). L'augmentation importante de la CPP dans le groupe Cig±GW9662 montre que le GW9662 a pu empêcher les effets cardioprotecteurs de la ciglitazone, effets médiés par les PPARgamma.

### ***2-La dP/dt :***

La ciglitazone a pu légèrement améliorer la dP/dt, le GW9662 utilisé en combinaison avec la glitazone semblait abolir cette amélioration par un mécanisme PPARgamma dépendant. L'injection de cannabinoïdes seuls n'a pas vraiment affecter la dP/dt bien qu'une légère amélioration est notée mais toujours non significative. En revanche et à notre surprise, l'injection de GW9662 préalablement aux traitements par cannabinoïdes a beaucoup augmenté l'efficacité du traitement. Nous avons pu noter une récupération cardiaque importante en présence du GW9662. Il est également possible que les cannabinoïdes soient des agonistes doubles des PPARalpha et des PPARgamma, la grande affinité du GW9662 pour les PPARgamma conduisant au blocage de ces récepteurs et poussant les cannabinoïdes vers une seule voie qui est celle des PPARalpha. N'oublions pas que le PEA, selon Verme et coll., semble agir par une voie PPARalpha-dépendante (286).

Le traitement par WY15643 améliore la dP/dt, la combinaison du traitement fibraté à GW9662 produisant la même amélioration cardiaque observée pour le groupe traité par WY14643 seul. Les PPARalpha semblent jouer un rôle important dans la récupération cardiaque. Une faible amélioration de la dP/dt est observée dans le groupe ayant subi un PCI. Le GW9662 injecté juste avant le PCI n'a pas affecté cette amélioration. Nous avons pu étudier mieux la contractilité cardiaque dans le paramètre suivant.

### ***3-La différence entre la pression ventriculaire gauche systolique et diastolique :***

La différence entre la pression diastolique et systolique est un paramètre qui indique la contractilité cardiaque. D'après nos résultats, nous avons pu noter dès le début de l'expérience une amélioration significative de la contractilité cardiaque suite à l'injection du WY14643, l'injection de ciglitazone semblait maintenir une contractilité cardiaque stable durant les 35 premières minutes de l'expérience. Le PCI combiné ou pas à l'antagoniste GW9662 semblait diminuer cette contractilité. Les cannabinoïdes utilisés maintenaient une contractilité cardiaque stable, le GW9662 semblait ne pas affecter cette stabilité. A la fin de l'ischémie nous avons pu remarquer une amélioration de la contractilité cardiaque pour notre groupe traité par WY14643, cette amélioration s'accroissait en utilisant la combinaison WY14643 et GW9662. Les autres traitements n'avaient pas affecté la contractilité cardiaque à la fin de la période ischémique. Les résultats les plus intéressants seraient ceux notés à la fin de la reperfusion. C'est à ce moment là que nous avons pu juger la récupération cardiaque. Les cœurs qui récupéraient le mieux de tous nos groupes sur le plan de la contractilité cardiaque étaient ceux qui avaient été traités par une combinaison cannabinoïdes et GW9662. Ces résultats ne font que confirmer ce que nous avons déjà noté pour les autres paramètres. Nous avons déjà donné une explication de notre point de vue concernant ce type d'association de traitements au tout début de la discussion. Nos résultats concernant les cannabinoïdes utilisés seuls dans deux groupes de rats montraient une récupération légère de la contractilité cardiaque meilleure que celle observée pour notre groupe témoin. L'effet des cannabinoïdes sur la contractilité cardiaque a été déjà testé dans le laboratoire du Dr Lamontagne (170). Nos résultats, bien que pas tous significatifs (nombre de groupes élevés) semblent confirmer l'abilité des endocannabinoïdes et de la ciglitazone à protéger la contractilité cardiaque post-ischémique. Les mécanismes d'action de

la cardioprotection observée avec les TZDs sont multifactoriels et mal compris. Le GW9662 a pu complètement antagoniser les effets cardioprotecteurs de la ciglitazone pour confirmer encore une fois sa forte capacité à bloquer les PPARgamma.

#### ***4-La Fréquence cardiaque :***

C'est seulement à la fin des protocoles (fin de la reperfusion) que nous avons pu noter des différences significatives concernant la stabilité cardiaque entre les groupes. La ciglitazone paraît pouvoir entretenir une bonne stabilité du fonctionnement cardiaque tout au long du protocole. Ces résultats concordent avec ceux retrouvés dans la littérature. Le GW9662 a pu abolir complètement cette stabilité, nous avons ainsi noté une importante augmentation de la fréquence cardiaque lors du traitement combinant la ciglitazone et le GW9662. Les cannabinoïdes, la WY14643 et le PCI semblaient également fournir une certaine stabilité cardiaque largement étudiée dans la littérature et améliorée pour le PEA et pour le PCI par l'utilisation du GW9662. La combinaison WY14643+GW9662 nous a semblé intéressante. Nous avons pu noter une diminution de la fréquence cardiaque. La question qui s'est posée est la suivante : *est ce que le GW9662 en présence d'un agoniste des PPARalpha ou d'un agoniste double PPARalpha/PPARGamma a des effets bradycardiaques ?* cela semble rejoindre ce que nous avons déjà noté pour les autres paramètres. Le GW9662 semble en fait jouer un rôle très important dans le métabolisme cellulaire cardiaque. Nous pensons que la durée du protocole n'était pas suffisante pour tirer des conclusions et répondre à cette question. En fait, ce n'est que dans les études cliniques à plus ou moins long terme que l'effet d'un traitement sur la stabilité de la fréquence cardiaque peut être précisément étudié.

### *Conclusions*

Les conclusions que nous avons pu tirer de nos résultats sont les suivantes :

1. Les PPARgamma semblent être une cible très importante en terme de diminution des lésions cardiaques post-ischémiques.
2. Les PPARalpha semblent jouer un rôle primordial dans la récupération de la contractilité cardiaque post-ischémique et de la diminution des lésions d'infarctus.
3. La probabilité de l'existence d'interactions croisées entre les PPARgamma et les PPARalpha.
4. Le CD36 semble interférer dans le phénomène de cardioprotection post-ischémique induit par activation des PPARgamma.
5. Les effets cardioprotecteurs observés suite à l'injection des cannabinoïdes pourraient impliquer partiellement les PPARgamma.

### *Perspectives*

Pour pousser nos investigations sur les relation cannabinoïdes-PPARs et PCI-PPARs, il faudrait travailler sur des modèles se souris déficientes en PPARalpha (PPARalpha<sup>-/-</sup>). Il serait en effet souhaitable de tester si l'effet cardioprotecteur des cannabinoïdes et du PCI disparaît chez des souris n'exprimant pas ce récepteur nucléaire. Ce modèle permettrait également de tester l'interaction croisée entre le PPARgamma et le PPARalpha d'une manière plus précise. Pour chercher le rôle exact du récepteur CD36 dans la cardioprotection cardiaque, un protocole expérimental utilisant l'injection de différentes glitazones sur des souris WT et CD36<sup>-/-</sup> préalablement traitées aux GHRP serait une bonne approche.

**LISTES DE REFERENCES**

1. ABADJI V, LIN S, TAHA G, GRIFFIN G, STEVENSON LA, PERTWEE RG, AND MAKRIYANNIS A. **(R)-methanandamide: a chiral novel anandamide possessing higher potency and metabolic stability.** *J Med Chem* 1994;37:1889–1893 .

2. ADAMS M, MONTAGUE CT, PRINS JB, HOLDER JC, SMITH SA, SANDERS L, DIGBY JE, SEWTER CP, LAZAR MA, CHATTERJEE VK, O'RAHILLY S. **Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation.** *J Clin Invest.* 1997;100(12):3149-3153.

3. ADAMS M, REGINATO M J , SHAO D, LAZAR M A , CHATTERJEE V K. **Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site.** *J Biol Chem.* 1997;272(8):5128–5132.

4. AKERSTROM B, FLOWER DR, AND SALIER JP. **Lipocalins: unity in diversity.** *Biochim Biophys Acta.* 2000;1482:1–8.

5. AUWERX J. **PPAR $\gamma$ , the ultimate thrifty gene.** *Diabetologia.* 1999;42:1033–1049.

6. BAJAJ M, SURAMORNKUL S, PIPER P, HARDIES LJ, GLASS L, CERSOSIMO E, PRATIPANAWATR T, MIYAZAKI Y, DEFRONZO RA. **Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to hepatic fat content and hepatic insulin resistance in pioglitazone-treated type 2 diabetic patients.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(1):200-206.

7. BANERJEE A, LOCKE-WINTER C, ROGERS KB, MITCHELL MB, BREW EC, CAIRNS CB, BENSARD DD, HARKEN AH. **Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism.** *Circ Res.* 1993;73:656-70.

8. BARTHEL H, EBEL D, MULLENHEIM J, OBAL D, PRECKEL B, SCHLACK W. **Effect of lidocaine on ischaemic preconditioning in isolated rat heart.** *Br J Anaesth.* 2004;93(5):698-704.

9. BARZILIA N, GUPTA G. **revisiting the role of fat mass in the life extension induced by caloric restriction.** *J. Gerontol., Ser A.* 1999;54A:B89-B96.

10. BAXTER GF, GOMA FM, YELLON DM. **Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischemia in rabbit myocardium.** *Br J Pharmacol.* 1995;115:222-224.

11. BAXTER GF. **Ischaemic preconditioning of myocardium.** *Ann Med.* 1997;29(4):345-352.

12. BELTRAMO M AND PIOMELLI D. **Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol.** *Neuroreport.* 2000;11:1231-1235.

13. BELTRAMO M, DE FONSECA FR, NAVARRO M, CALIGNANO A, GORRITI MA, GRAMMATIKOPOULOS G, SADILE AG, GIUFFRIDA A, PIOMELLI D. **Reversal of dopamine D2 receptor responses by an anandamide transport inhibitor.** *J Neurosci.* 2000;20:3401-3407.

14. BELTRAMO M, STELLA N, CALIGNANO A, LIN SY, MAKRIYANNIS A, AND PIOMELLI D. **Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition.** *Science*. 1997;277:1094-1097.

15. BERGER J, BAILY P, BISWAS C, CULLINAN CA, DOEBBER TW, HAYES NS, SAPERSTEIN R, SMITH RG, LEIBOWITZ MD. **Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice.** *Endocrinology*. 1996;137:4189-4195

16. BERGER J, LEIBOWITZ MD, DOEBBER TW, ELBRECHT A, ZHANG B, ZHOU G, BISWAS C, CULLINAN CA, HAYES NS, LI Y, TANEN M, VENTRE J, WU MS, BERGER GD, MOSLEY R, MARQUIS R, SANTINI C, SAHOO SP, TOLMAN RL, SMITH RG, MOLLER DE. **Novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma and delta ligands produce distinct biological effects.** *J Biol Chem*. 1999;274:6718-6725.

17. BERGER JP, PETRO AE, MACNAUL KL, KELLY LJ, ZHANG BB, RICHARDS K, ELBRECHT A, JOHNSON BA, ZHOU G, DOEBBER TW, BISWAS C, PARIKH M, SHARMA N, TANEN MR, THOMPSON GM, VENTRE J, ADAMS AD, MOSLEY R, SURWIT RS, MOLLER DE. **Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein [gamma] selective modulator.** *Mol Endocrinol*. 2003;17(4):662-676.

18. BILLY R. MARTIN, LAURA J. SIM-SELLEY AND DANA E. SELLEY. **Signaling pathways involved in the development of cannabinoid tolerance.** *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(6):325-30.

19. BISOGNO T, BERRENDERO F, AMBROSINO G, CEBEIRA M, RAMOS JA, FERNANDEZ-RUIZ JJ, DI MARZO V. **Brain regional distribution of**

**endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;256:377-380.

20. BISOGNO T, MACCARRONE M, DE PETROCELLIS L, JARRAHIAN A, FINAZZIAGRO A, HILLARD C, AND DI MARZO V. **The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors.** *Eur J Biochem.* 2001; 268:1982–1989.

21. BISOGNO T, SEPE N, MELCK D, MAURELLI S, DE PETROCELLIS L, DI MARZO V. **Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells.** *Biochem J.* 1997 ;322:671-677.

22. BLANQUART C ,BARBIER O, FRUCHART JC, STAELS B, GLINEUR C. **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) turnover by the ubiquitin–proteasome system controls the ligandinduced expression level of its target genes.** *J Biol Chem.* 2002;277(40):37254–37259.

23. BLANQUART C, BARBIER O, FRUCHART JC, STAELS B, GLINEUR C. **Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation.** *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;85(2-5):267-73.

24. BLUMCKE S, SCHWARTZKOPF W, LOBECK H, EDMONDSON NA, PRENTICE DE, BLANE GF. **Influence of fenofibrate on cellular and subcellular in hyperlipidemic patients.** *Atherosclerosis.* 1983;46:105-116

25. BOGER DL, FECIK RA, PATTERSON JE, MIYAUCHI H, PATRICELLI MP, AND CRAVATT BF. **Fatty acid amide hydrolase substrate specificity.** *Bioorg Med Chem Lett.* 2000;10: 2613–2616.

26. BOGER DL, SATO H, LERNER AE, HEDRICK MP, FECIK RA, MIYAUCHI H, WILKIE GD, AUSTIN BJ, PATRICELLI MP, AND CRAVATT BF. **Exceptionally potent inhibitors of fatty acid amide hydrolase: the enzyme responsible for degradation of endogenous oleamide and anandamide.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97: 5044–5049.

27. BOLLI R, MANCHIKALAPUDI S, TANG XL, BOLLI R, MANCHIKALAPUDI S, TANG XL, TAKANO H, QIU Y, GUO Y, ZHANG Q, JADOON AK. **The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase. Evidence that nitric oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning.** *Circ Res.* 1997;81:1094-107.

28. BOUABOULA M, POINOT-CHAZEL C, BOURRIE B, CANAT X, CALANDRA B, RINALDI-CARMONA M, LE FUR G, CASELLAS P. **Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1.** *Biochem J.* 1995;312:637–641.

29. BOUCHARD JF, LAMONTAGNE D. **Mechanisms of protection afforded by preconditioning to endothelial function against ischemic injury.** *Am J Physiol.* 1996;271(5 Pt 2):H1801-6.

30. BOUCHARD JF, LEPICIER P, LAMONTAGNE D. **Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart.** *Life Sci.* 2003;72(16):1859-1870

31. BROWN KK, HENCE BR, BLANCHARD SG, COBB JE, KALDOR I, KLIEWER SA, LEHMANN JM, LENHARD JM, HARRINGTON W, NOVAK PJ, BINZ J, HASHIM MA, OLIVER WO, BROWN HR, PARKS DJ, PLUNKET KD, TONG T, MENIUS A, ADKINSON KK, NOBLE SA, WILLSON TM. **A novel N-aryl tyrosine activator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma reverses the diabetic phenotype of the zucker diabetic fatty rat.** *Diabetes*. 1999;1415-1142.

32. BUCKLE R, CANTELLO BCC, CAWTHORN MA, COYLE PJ, DEAN DK, FALLER A, HAIGH D, HINDLEY RM, JEF COTT LJ, LISTER CA, PINTO IL, RAMI HK, SMITH DG, SMITH SA. **Non-thiazolidinedione antihyperglycemic agents. 1: alpha-heteroatom substituted beta-phenylpropanoic acids.** *Bioorg Med Chem Lett*. 1996;6:2121-2126.

33. BUCKLE R, CANTELLO BCC, CAWTHORN MA, COYLE PJ, DEAN DK, FALLER A, HAIGH D, HINDLEY RM, JEF COTT LJ, LISTER CA, PINTO IL, RAMI HK, SMITH DG, SMITH SA. **Non-thiazolidinedione antihyperglycemic agents. 2: alpha-carbon substituted beta-phenylpropanoic acids.** *Bioorg Med Chem Lett*. 1996;6:2127-2130.

34. BUCKLEY NE, MCCOY KL, MEZEY E, BONNER T, ZIMMER A, FELDER CC, GLASS M, ZIMMER A. **Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB2 receptor.** *Eur J Pharmacol*. 2000;396:141-149.

35. BULHAK A, SJOQUIST PO, PERNOW J. **Activation of PPAR-alpha protects the myocardium from ischaemia-reperfusion injury: Involvement of nitric oxide.** *Cardiovasc J S Afr*. 2004;15(4 Suppl 1):S11-2.

36. CADAS H, GAILLET S, BELTRAMO M, VENANCE L, AND PIOMELLI D. **Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP.** *J Neurosci.* 1996;16: 3934–3942.

37. CADAS H, DI TOMASO E, AND PIOMELLI D. **Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, *N*-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain.** *J Neurosci.* 1997;17:1226–1242.

38. CALIGNANO A, LA RANA G, AND PIOMELLI D. **Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide.** *Eur J Pharmacol.* 2001;419:191–198.

39. CALIGNANO A, LA RANA G, GIUFFRIDA A, AND PIOMELLI D. **Control of pain initiation by endogenous cannabinoids.** *Nature.* 1998;394:277–281.

40. CALVO D, GOMEZ-CORONADO D, SUAREZ Y, LASUNCION MA, VEGA MA. **Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL.** *J Lipid Res.* 1998;39:777–788.

41. CAMP H S , TAFURI S R, LEFF T. **c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-1 and negatively regulates its transcriptional activity.** *Endocrinology.* 1999;140 : 392–397.

42. CAO CM, XIA Q, GAO Q, CHEN M, WONG TM. **Calcium-Activated Potassium Channel Triggers Cardioprotection of Ischemic Preconditioning.** *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312(2):644–650.

43.CAREY DG, COWIN GJ, GALLOWAY GJ, JONES NP, RICHARDS JC, BISWAS N, DODDRELL DM. **Effect of rosiglitazone on insulin sensitivity and body composition in type 2 diabetic patients.** *Obes Res.* 2002;10(10):1008-15.

44.CHAWLA A, BOISVERT WA, LEE CH, LAFFITTE BA, BARAK Y, JOSEPH SB, LIAO D, NAGY L, EDWARDS PA, CURTISS LK, EVANS RM, TONTONNOZ P.A **PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis.** *Mol Cell.* 2001;7(1):161-71.

45.CHAWLA A, SCHWARZ EJ, DIMACULANGAN DD, LAZAR MA. **Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)g: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation.** *Endocrinology.* 1994;135:798–800

46.CHINETTI G, LESTAVEL S, BOCHER V, ET AL. **PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway.** *Nat Med.* 2001;7:53–58.

47.CHUNG SW, KANG BY, KIM SH, PAK YK, CHO D, TRINCHIERI G, KIM TS. **Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B.** *J Biol Chem.* 2000;275(42) :32681–32687.

48.CLAY CE, ATSUMI GI, HIGH KP, CHILTON FH. **Early de novo gene expression is required for 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis in breast cancer cells.** *J Biol Chem.* 2001;276(50):47131-47135.

49. CLAY CE, NAMEN AM, ATSUMI G, WILLINGHAM MC, HIGH KP, KUTE TE, TRIMBOLI AJ, FONTEH AN, DAWSON PA, CHILTON FH. **Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells.** *Carcinogenesis*. 1999;20(10):1905-1911.

50. CLAYTON N, MARSHALL FH, BOUNTRA C, O'SHAUGHNESSY CT. **CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain.** *Pain*. 2002;96:253-60.

51. COBB JE, BLANCHARD SG, BOSWELL EG, BROWN KK, CHRIFSON PS, COOPER JP, COLLINS JL, DEZUBE M, HENCE BR, HULL-RYDE EA, LAKE DH, LENHARD JM, OLIVER W JR, OPLINGER J, PENTTI M, PARKS DJ, PLUNKET KD, TONG WQ. **N-(2-Benzoylphenyl)-L-tyrosine PPARgamma agonists. 3. Structure-activity relationship and optimization of the N-aryl substituent.** *J Med Chem*. 1998;41:5055-5069.

52. COHEN B, NOVICK D, RUBINSTEIN M. **Modulation of insulin activities by leptin.** *Science*. 1996;274:1185-1188

53. COHEN MV, LIU GS, DOWNEY JM. **Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits.** *Circulation*. 1991;84:341-9

54. CRAVATT BF, GIANG DK, MAYFIELD SP, BOGER DL, LERNER RA, AND GILULA NB. **Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides.** *Nature*. 1996;384:83-87.

55. CRAVATT BF, LICHTMAN AH. **The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior.** *J Neurobiol*. 2004;61(1):149-160.

56.CROCI T, MANARA L, AUREGGI G, GUAGNINI F, RINALDI-CARMONA M, MAFFRAND JP, LE FUR G, MUKENGE S, FERLA G. **In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum.** *Br J Pharmacol.* 1998;25:1393–1395.

57.CROMPTON M. **The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death.** *Biochem J.* 1999;341:233-249.

58.CUZZOCREA S, DI PAOLA R, MAZZON E, GENOVESE T, MUIA C, CAPUTI AP. **WY 14643, a potent exogenous PPAR-alpha ligand, reduces intestinal injury associated with splanchnic artery occlusion shock.** *Shock.* 2004;22(4):340-6.

59.CUZZOCREA S. **Peroxisome proliferator-activated receptors gamma ligands and ischemia and reperfusion injury.** *Vascul Pharmacol.* 2004;41(6):187-195.

60.DEADWYLER SA, HAMPSON RE, MU J, WHYTE A, CHILDERS S. **Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process.** *J Pharmacol Exp Therap.* 1995;273:734-743.

61.DELERIVE P, DE BOSSCHER K, BESNARD S, VANDEN BERGHE W, PETERS JM, GONZALEZ FJ, FRUCHART JC, TEDGUI A, HAEGEMAN G, STAELS B. **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1.** *J Biol Chem.* 1999;274(45):32048-3254.

62. DE PETROCELLIS L, BISOGNO T, DAVIS JB, PERTWEE RG, AND DI MARZO V. **Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity.** *FEBS Lett.* 2000;483: 52–56.

63. DERKINDEREN P, LEDENT C, PARMENTIER M, GIRAULT JA. **Cannabinoids activate p38 mitogenactivated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus.** *J Neurochem.* 2001;77:957–960.

64. DERKINDEREN P, TOUTANT M, BURGAYA F, LE BERT M, SICILIANO JC, DE FRANCISCIS V, GELMAN M, GIRAULT JA. **Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide.** *Science.* 1996;273:1719–1722.

65. DERKINDEREN P, TOUTANT M, KADARE G, LEDENT C, PARMENTIER M, GIRAULT JA. **Dual role of Fyn in the regulation of FAK+6,7 by cannabinoids in hippocampus.** *J Biol Chem.* 2001;23:38289-38296.

66. DERKINDEREN P, VALJENT E, DARCEL F, DAMIER P, GIRAULT JA. **Cannabis and cannabinoid receptors: from pathophysiology to therapeutic options.** *Rev Neurol (Paris).* 2004;160(6-7):639-49.

67. DERKINDEREN P, VALJENT E, TOUTANT M, CORVOL JC, ENSLEN H, LEDENT C, TRZASKOS J, CABOCHE J, GIRAULT JA. **Regulation of extracellular signal regulated kinase by cannabinoids in hippocampus.** *J Neurosci.* 2003;23, 2371–2382.

68. DESARNAUD F, CADAS H, AND PIOMELLI D. **Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization.** *J Biol Chem.* 1995;270: 6030–6035.

69. DEUTSCH DG, GOLIGORSKY MS, SCHMID, P., KREBSBACH RJ, SCHMID HHO, DAS SK, DEY SK, ARREAZA ., THORUP C, STEFANO G & MOORE LC. **Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney.** *J Clin Invest.* 1997;100:1538:1546.

70. DEVANE WA, HANUS L, BREUER A, PERTWEE RG, STEVENSON LA, GRIFFIN G, GIBSON D, MANDELBAUM A, ETINGER A, AND MECHOULAM R. **Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor.** *Science.* 1992;258:1946–1949.

71. DILLMANN WH, MEHTA HB, BARRIEUX A, GUTH BD, NEELEY WE, ROSS J JR. **Ischemia of the dog heart induces the appearance of a cardiac mRNA coding for a protein with migration characteristics similar to heat shock/stress protein 71.** *Circ Res.* 1986;59:110-114.

72. DI MARZO V, FONTANA A, CADAS H, SCHINELLI S, CIMINO G, SCHWARTZ JC, AND PIOMELLI D. **Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons.** *Nature.* 1994;372: 686–691.

73. DINH TP, CARPENTER D, LESLIE FM, FREUND TF, KATONA I, SENSI SL, KATHURIA S, AND PIOMELLI D. **Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:10819–10824.

74. DUVAL C, CHINETTI G, TROTTEINF, FRUCHART JC, STAELS B. **The role of PPARs in atherosclerosis.** *Trends Mol Med.* 2002;8(9):422–430.

75. ELBRECHT A, CHEN Y, ADAMS A, BERGER J, GRIFFIN P, KLATT T, ZHANG B, MENKE J, ZHOU G, SMITH RG, MOLTER DE. **L764406 is a partial agonist of human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. The role of Cys<sup>313</sup> in ligand binding.** *J Biol Chem.* 1999;274:7913–7922.

76. ELLIS, E.F., MOORE, S.F. & WILLOUGHBY, K.A. **Anandamide and delta 9-THC dilation of cerebral arterioles is blocked by indomethacin.** *Am J Physiol.* 1995;269:H1859:H1864.

77. ELSTNER E, MULLER C, KOSHIZUKA K, WILLIAMSON EA, PARK D, ASOU H, SHINTAKU P, SAID JW, HEBER D, KOEFFLER HP. **Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(15):8806–11.

78. EVANS DM, JOHNSON MR, AND HOWLETT AC. **Ca<sup>2+</sup>-dependent release from rat brain of cannabinoid receptor binding activity.** *J Neurochem.* 1992;58:780–782.

79. EVANS DM, LAKE JT, JOHNSON MR, AND HOWLETT AC. **Endogenous cannabinoid receptor binding activity released from rat brain slices by depolarization.** *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;268:1271–1277.

80. FACCI L, DAL TOSO R, ROMANELLO S, BURIANI A, SKAPER SD, AND LEON A. **Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with**

**differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:3376–3380.

81.FEZZA F, BISOGNO T, MINASSI A, APPENDINO G, MECHOULAM R, AND DI MARZO V. **Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues.** *FEBS Lett.* 2002;513:294–298.

82.FLOYD ZE, STEPHENS JM. **Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin–proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes.** *J Biol Chem.* 2002;277(6):4062–4068.

83.FORD WR, HONAN SA, WHITE R, HILEY CR. **Evidence of a novel site mediating anandamide-induced negative inotropic and coronary vasodilator responses in rat isolated hearts.** *Br J Pharmacol.* 2002;135(5):1191-1198.

84.FORMAN BM, TONTONOZ P, CHEN J, BRUN RP, SPIEGELMAN BM, EVANS RM. **15-deoxy-delta<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> is a ligand for the adipocyte determination factor PPARgamma.** *Cell.* 1995;83:803-812.

85.FRIDE E AND MECHOULAM R. **Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent.** *Eur J Pharmacol.* 1993;231: 313–314.

86.FRUEBIS J, TSAO TS, JAVORSCHI S, EBBETS-REED D, ERICKSON MR, YEN FT, BIHAIN BE, LODISH HF. **Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:2005–2010

87.FULTON, D. & QUILLEY, J. **Evidence against anandamide asv the hyperpolarizing factor mediating the nitric oxide-independent coronary vasodilator e.ect of bradykinin in the rat.** *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;286:1146 :1151.

88.GALIEGUE S, MARY S, MARCHAND J, DUSSOSSOY D, CARRIERE D, CARAYON P, BOUABOULA M, SHIRE D, LE FUR G, CASELLAS P. **Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations.** *Eur J Biochem.* 1995;232:54–61.

89.GARLID KD AND PAUCEK P. **Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle.** *Biochim Biophys Acta.* 2003;1606: 23-41

90.GARLID KD. **Opening mitochondrial K(ATP) in the heart: what happens and what does not happen.** *Basic Res Cardiol.* 2000;95: 275-279.

91.GARLID KD, PAUCEK P, YAROV-YAROVOY V, MURRAY HN, DARBENZIO RB, D'ALONZO AJ, LODGE NJ, SMITH MA, AND GROVER GJ. **Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: possible mechanism of cardioprotection.** *Circ Res.* 1997;81:1072-1082.

92.GAVRILOVA O, HALUZIK M, MATSUSUE K, CUTSON JJ, JOHNSON L, DIETZ KR, NICOL CJ, VINSON C, GONZALEZ FJ, REITMAN ML. **Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass.** *J Biol Chem.* 2003;278(36):34268-3476.

93. GEBREMEDHIN, D., LANGE, A.R., CAMPBELL, W.B., HILLARD, C.J. & HARDER, D.R. **Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca<sup>2+</sup> channel current.** *Am J Physiol.* 1995;276:H2085:H2093.

94. GÉRARD CM, MOLLEREAU C, VASSART G, PARMENTIER M. **Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis.** *Biochem J.* 1991;279:129-134.

95. GIMENEZ F, M BRAZIER, CALOP J, DINE T, TCHIAKPÉ L. **Pharmacie clinique et thérapeutique.** *Masson, Paris, 2000.*

96. GIRNUN GD, SPIEGELMAN BM. **PPAR $\gamma$  ligands: taking part in chemoprevention.** *Gastroenterology.* 2003;124(2):564-567.

97. GIUFFRIDA A AND PIOMELLI D. **The endocannabinoid system: a physiological perspective on its role in psychomotor control.** *Chem Phys Lipids.* 2000;108:151-158.

98. GIUFFRIDA A, PARSONS LH, KERR TM, RODRIGUEZ DE FONSECA F, NAVARRO M, AND PIOMELLI D. **Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum.** *Nat Neurosci.* 1999;2:358-363.

99. GOPARAJU SK, UEDA N, TANIGUCHI K, AND YAMAMOTO S. **Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors.** *Biochem Pharmacol* 1999;57:417-423.

100.GOPARAJU SK, UEDA N, YAMAGUCHI H, AND YAMAMOTO S. **Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand.** *FEBS Lett.* 1998;422:69–73.

101.GOMEZ DEL PULGAR T. VELASCO G, GUZMAN M. **The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt.** *Biochem J.* 2000;347:369–373.

102.GRIFFITHS EJ AND HALESTRAP AP. **Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion.** *Biochem J.* 1995;307: 93-98

103.GRIFFITHS EJ AND HALESTRAP AP. **Protection by cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts.** *J Mol Cell Cardiol.* 1993;25:1461-1469.

104.GROSS GJ, FRYER RM. **Sarcolemmal versus mitochondrial ATPsensitive K<sup>+</sup> channels and myocardial preconditioning.** *Circ Res* 1999;84:973–979.

105.GROSS GJ, MEI DA, SCHULTZ JJ, MIZUMURA T. **Criteria for a mediator or effector of myocardial preconditioning: do KATP channels meet the requirements?** *Basic Res Cardiol.* 1996;91:31–34.

106.GRUNDY S M. **the optimal ratio of fat-to-carbohydrate in the diet.** *Annu Rev Nutr.* 1999; 60:421-429

107.HAIGH D, ALLEN G, BIRELL HC, BUCKLE DR, CANTELLO BCC, EGGLESTON DS, HALTUWANGER RC, HOLDER JC, LISTER CA, PINTO IL, RAMI HK, SIME JT, SMITH SA, SWEENEY JD. **Non-**

**thiazolidinedione antihyperglycemic agents. Part 3: The effects of stereochemistry on the potency of alphanmethoxy-beta-phenylpropanoic acids.** *Bioorg Med Chem Lett.* 1999;7:821-830.

108.HALESTRAP AP, KERR PM, JAVADOV S, AND WOODFIELD KY. **Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart.** *Biochim Biophys Acta* 1998;1366: 79-94

109.HAN J, HAJJAR DP, TAURAS JM, FENG J, GOTTO AM JR., NICHOLSON AC. **Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen- activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator- activated receptor-gamma.** *J Biol Chem.* 2000;275(2):1241–1246.

110.HANUS L, ABU-LAFI S, FRIDE E, BREUER A, VOGEL Z, SHALEV DE, KUSTANOVICH I, AND MECHOULAM R. **2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:3662–3665.

111.HANUS L, GOPHER A, ALMOG S, AND MECHOULAM R. **Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor.** *J Med Chem.* 1993;36:3032–3034.

112.HARRIS MI, FLEGAL KM, COWIE CC, EBERHARDT MS, GOLDSTEIN DE, LITTLE RR, WEIDMEYER HM, BYRD-HOLT DD. **prevelence of diabetes , impaired fasting glucose and impared glucose tolerance in U.S. adults. the third national health and nutrition examination survey, 1988-1994.** *DAIBETES CARE.* 1998;21:518-524.

- 113.HARRIS PKW, KLETZIEN RF. **Localization of a pioglitazone response element in the adipocyte fatty acid-binding protein gene.** *Mol. Pharmacol.* 1994;45:439-445.
- 114.HAUSENLOY DJ, MADDOCK HL, BAXTER GF, AND YELLON DM. **Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning?** *Cardiovasc Res.* 2002;55:534-543
- 115.HAUSENLOY D, WYNNE A, DUCHEN M, AND YELLON D. **Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection.** *Circulation.* 2003;109: 1714-1717.
- 116.HAUSER S, ADELMANT G, SARRAF P, WRIGHT HM, MUELLER E, SPIEGELMAN BM. **Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation.** *J Biol Chem.* 2000;24:18527-18533.
- 117.HENKE BR, BLANCHARD SG, BRACKEN MF, BROWN KK, COBB JE, COLLINS JL, HARRINGTON WW, HASHIM MA, HULL-RYDE EA, KALDOR I, KLIEWER SA, LAKE DH, LEESNITZER LM, LEHMANN JM, LENHARD JM, ORBANDMILLER LA, MILLER JF, MOOK RA, NOBLE SA, OLIVER W, PARKS DJ, PLUNKET KD, SZEWCZYK JR, WILLSON TM. **N-(2-benzoylphenyl)-L-tyrosine PPARgamma agonists. 1. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents.** *J Med Chem.* 1998;41:5020-5036.

118.HENKE BR, ADKISON KK, BLANCHARD SG, LEESNITZER LM, ROBERT A, MOOK J, KELLI D PLUNKET, RAY JA, ROBERSON C, UNWALLA R, WILLSON TM. **Synthesis and biological activity of a novel series of indole-derived PPARgamma agonists.** *Bioorg Med Chem Lett.* 1999;9:3329-3334.

119.HENKE BR. **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma dual agonists for the treatment of type 2 diabetes.** *J Med Chem.* 2004;47(17):4118-4127.

120.HERKENHAM M, LYNN AB, JOHNSON MR, MELVIN LS, DE COSTA BR, RICE KC. **Characterization and localization of cannabinoid receptors in the rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study.** *J Neurosci.* 1991;11:563-583.

121.HEVENER AL, HE W, BARAK Y, LE J, BANDYOPADHYAY G, OLSON P, WILKES J, EVANS RM, OLEFSKY J. **Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance.** *Nat Med.* 2003;(12):1491-1507.

122.HE W, BARAK Y, HEVENER A, OLSON P, LIAO D, LE J, NELSON M, ONG E, OLEFSKY JM, EVANS RM. **Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(26):15712-7. Epub 2003 Dec 05.

123.HODGES M, TISSOT C, FREEMONT PS. **Protein regulation: tag wrestling with relatives of ubiquitin.** *Curr Biol.* 1998;8(21):R749-R752.

124.HOTAMISLIGIL GS, SHARGILL NS, SPIEGELMAN BM. **Adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha : direct role in obesity linked insulin resistance.** *Science*. 1993;259:87-91

125.HOWARD BV. **Diet, insulin resistance, and atherosclerosis.** *Int congress*. 1995;1100:446-450

126.HO WS, HILEY CR. **Vasorelaxant activities of the putative endocannabinoid virodhamine in rat isolated small mesenteric artery.** *J Pharm Pharmacol*. 2004;56(7):869-75.

127.HUANG JT, WELCH JS, RICOTE M, BINDER CJ, WILLSON TM, KELLY C, WIZTUM JL, FUNK CD, CONRAD D, GLASS CK. **Interleukin-4-dependent production of PPARgamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase.** *Nature*. 1999;400:378-382.

128.HU E, KIM JB , SARRAF P , SPIEGELMAN BM. **Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma.** *Science*. 1996;274(5295):2100-2103.

129.HU K, DUAN D, LI GR, NATTEL S. **Protein kinase C activates ATP-sensitive K<sup>+</sup> current in human and rabbit ventricular myocytes.** *Circ Res*. 1996;78:492-8.

130.HULIN B, MCCARTHY PA, GIBBS, EM. **The glitazones family of antidiabetic agents.** *Curr Pharm Des*. 1996;2:85-102.

131.HUNTER DR AND HAWORTH RA. **The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria: I. The protective mechanisms.** *Arch Biochim Biophys*. 1979;195:453-459.

132.IBRAHIMI A, TEBOUL L , GAILLARD D, AMRI E,Z, AILHAUD G, YOUNG P, CAWTHORNE MA, GRIMALDI PA. **Evidence for a common mechanism of action for fatty acids and thiazolidinediones antidiabetic agents on gene expression in preadipose cells.** *Mol Pharmacol.* 1994.;46:1070-1076.

133.IDE T, MURAKAMI K, TOBE K, MOCHIZUKI T, OHASHI M, AKANUMA Y, KADOWAKI T, YAZAKI Y. **Effects of PPARalpha activation on liver metabolism in Zucker fatty rats.** *Diabetes Front.* 1998;9:345-346.

134.ITAMI A, WATANABE G, SHIMADA Y, HASHIMOTO Y, KAWAMURA J, KATO M, HOSOTANI R, IMAMURA M. **Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit growth of pancreatic cancers both in vitro and in vivo.** *Int J Cancer.* 2001;94(3):370-6.

135.JAGGAR SI, HASNIE FS, SELLATURAY S, AND RICE AS. **The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain.** *Pain.* 1998;76:189-199.

136.JARAI Z., WAGNER, J.A., GOPARAJU, S.K., WANG, L., RAZDAN, R.K., SUGIURA, T., ZIMMER, A.M., BONNER, T.I., ZIMMER, A. & KUNOS, G. (2000). **Cardiovascular effects of 2 arachidonoyl glycerol in anesthetized mice.** *Hypertension.* 2000;35:679-684.

137.JARRAHIAN A, MANNA S, EDGEMOND WS, CAMPBELL WB, AND HILLARD CJ. **Structure-activity relationships among N-**

**arachidonylethanolamine (Anandamide) head group analogues for the anandamide transporter.** *J Neurochem.* 2000;74:2597–2606.

138.JAVADOV SA, CLARKE S, DAS M, GRIFFITHS EJ, LIM KH, AND HALESTRAP AP. **Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart.** *J Physiol.* 2003;549: 513-524.

139.JIN ZQ, GOETZL EJ, KARLINER JS. **Sphingosine kinase activation mediates ischemic preconditioning in murine heart.** *Circulation.* 2004;110(14):1980-1989.

140.JOYEUX M, ARNAUD C, GODIN-RIBUOT D, DEMENGE P, LAMONTAGNE D, RIBUOT C. **Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts.** *Cardiovascular Research.* 2002;55:619.

141.JUMP DB, CLARKE SD. **Regulation of gene expression by dietary fat.** *Annu Rev Nutr.* 1999;19:63-90

142.JUNGLING EJ, KAMMERMEIER H. **A one-vial method for routine extraction and quantification of free fatty acids in blood and tissue by HPLC.** *Anal Biochem.* 1988;171:150-157.

143.KARLINER JS. **Mechanisms of cardioprotection by lysophospholipids.** *Journal of Cellular Biochemistry.* 2004;92:1095-1103

144.KARLSSON M, CONTRERAS JA, HELLMAN U, TORNQVIST H, AND HOLM C. **cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to**

**esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases.** *J Biol Chem.* 1997;272:27218–27223.

145.KATO M, NAGAYA T, FUJIEDA M, SAITO K, YOSHIDA J, SEO H. **Expression of PPARgamma and its ligand-dependent growth inhibition in human brain tumor cell lines.** *Jpn J Cancer Res.* 2002;93(6):660-6.

146.KHANDOUDI N, DELERIVE P, BERREBI-BERTRAND I, BUCKINGHAM RE, STAELS B, BRIL A. **Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, inhibits the Jun NH(2)-terminal kinase/activating protein 1 pathway and protects the heart from ischemia/reperfusion injury.** *Diabetes.* 2002;51(5):1507-1514.

147.KIM Y, SUH N, SPORN M, REED JC. **An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis.** *J Biol Chem.* 2002;277(25):22320-22329.

148.KLEEMANN R, GERVOIS .P, VERSCHUREN L, STAELS B, PRINCEN HM, KOOISTRA T. **Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation.** *Blood.* 2003;101(2): 545–551.

149.KLEIN TW, NEWTON C, FRIEDMAN H. **Cannabinoid receptors and immunity.** *Immunol Today.* 1998;19:373-381.

150.KLIEWER SA, FORMMAN BM, BLUMBERG B, ONG E, BORGMAYER U, MANGELSDORF DJ, UMESONO K, EVANS RM. **Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:7355-7359.

151.KLIEWER SA, LENHARD JM, WILLSON TM, PATEL I, MORRIS DC, LEHMANN J. **A prostaglandin J<sub>2</sub> metabolite binds peroxisome proliferator proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation.** *Cell*. 1995;83:813-819.

152.KLIEWER SA, SUNDSETH SS, JONES SA, BROWN PJ, WISELY GB, KOBLE C, DEVCHAND P. WAHLI W, WILLSON TM, LENHARD JM, LEHMANN JM. **Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:4318-4323

153.KNIGHT DM, CHAPMAN AB, NAVRE M, DRINKWATER L, BRUNO JJ, RINGOLD GM. **Requirements of triggering of adipocyte differentiation by glucocorticoids and indomethacin.** *Mol Endocrinol*. 1987;1:36-43.

154.KNOUFF C, AUWERX J. **Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology.** *Endocr Rev*. 2004;25(6):899-918.

155.KOWALTOWSKI AJ, SEETHARAMAN S, PAUCEK P, AND GARLID KD. **Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H649-H657.

156.KROEMER G, DALLAPORTA B, AND RESCHE-RIGON M. **The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis.** *Annu Rev Physiol*. 1998;60:619-642

157.KUZUYA T, HOSHIDA S, YAMASHITA N, FUJI H, OE H, HORI M, KAMADA T, TADA M. **Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia.** *Circ Res.* 1993;72:1293-1299.

158.LAKE, K.D., COMPTON, D.R., VARGA, K., MARTIN, B.R. & KUNOS, G. **Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats mediated by CB1-like cannabinoid receptors.** *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;281:1030-1037.

159.LAGNEUX C, LAMONTAGNE D. **Involvement of cannabinoids in the cardioprotection induced by lipopolysaccharide.** *British Journal of Pharmacology.* 2001;132:793–6.

160.LANG W, QIN C, LIN S, KHANOLKAR AD, GOUTOPOULOS A, FAN P, ABOUZID K, MENG Z, BIEGEL D, AND MAKRIYANNIS A. **Substrate specificity and stereoselectivity of rat brain microsomal anandamide amidohydrolase.** *J Med Chem.* 1999;42: 896–902.

161.LAW RE, MEEHAN WP, XI XP, GRAF K, WUTHRICH DA, COATS W, FAXON D, HSUEH WA. **Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia.** *J Clin Invest.* 1996;98(8):1897–1905.

162.LAY L, ANGUS JA & WRIGHT CE. **Pharmacological characterisation of cannabinoid CB(1) receptors in the rat and mouse.** *Eur J Pharmacol.* 2000;391:151-161.

163.LAZENNEC G, CANAPLE L, SAUGY D, WAHLI W. **Activation of peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators.** *Mol Endocrinol.* 2000;14(12):1962–1975.

164.LEA MA, SURA M, DESBORDES C. **Inhibition of cell proliferation by potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonists and antagonists.** *Anticancer Res.* 2004;24(5A):2765-71.

165.LEBOVITZ HE, KREIDER M, FREED MI. **Evaluation of liver function in type 2 diabetic patients during clinical trials: evidence that rosiglitazone does not cause hepatic dysfunction.** *Diabetes Care.* 2002;25(5):815-821

166.LEDENT C, VALVERDE O, COSSU G, PETITET F, AUBERT JF, BESLOT F, BOHME GA, IMPERATO A, PEDRAZZINI T, ROQUES BP, VASSART G, FRATTA W, PARMENTIER M. **Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice.** *Science.* 1999;283:401-404.

167.LEESNITZER LM, PARKS DJ, BLEDSOE RK, COBB JE, COLLINS JL, CONSLER TG, DAVIS RG, HULL-RYDE EA, LENHARD JM, PATEL L, PLUNKET KD, SHENK JL, STIMMEL JB, THERAPONTOS C, WILLSON TM, BLANCHARD SG. **Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662.** *Biochemistry.* 2002;41(21):6640-6650.

168.LEHMANN JM, LENHARD JM, OLIVER BB, RINGOLD GM, KLIEWER SA. **Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** *J Biol Chem.* 1997;272:3406-3410.

169.LEHMANN JM, MOORE LB, SMITH-OLIVER TA, WILKISON WO, WILLSON TM, KLIEWER SA. **An antidiabetic thiazolidinediones is a high**

**affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma.** *J Biol Chem.* 1995;270:12953-12956

170.LEPICIER P, BOUCHARD JF, LAGNEUX C, LAMONTAGNE D. **Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia.** *Br J Pharmacol.* 2003;139(4):805-815.

171.LI AC, BROWN KK, SILVESTRE MJ, WILLSON TM, PALINSKI W, GLASS CK. **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice.** *J Clin Invest.* 2000;106(4):523-531.

172.LICHTENSTEIN AH, KENNEDY E, BARRIER P, ERNST ND, GRUNDY SM, LEVEILLE GA, VAN HORNE L, WILLIAMS CL, BOOTH SL. **Dietary fat: a history.** *Nutr Rev.* 1999;57:11-14

173.LICHTENSTEIN AH, LICHTENSTEIN AH, KENNEDY E, BARRIER P, ERNST ND, GRUNDY SM, LEVEILLE GA, VAN HORNE L, WILLIAMS CL, BOOTH SL. **dietary fat consumption and health.** *Nutr Rev.* 1998;56:S3-S28

174.LICHTMAN AH, HAWKINS EG, GRIFFIN G, AND CRAVATT BF. **Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo.** *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302: 73-79.

175.LIGHT PE, SABIR AA, ALLEN BG, WALSH MP, FRENCH RJ. **Protein-kinase C-induced changes in the stoichiometry of ATP binding activate cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels.** *Circ Res.* 1996;79:399-406.

176.LI M, PASCUAL G, GLASS CK. **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene.** *Mol Cell Biol.* 2000;20(13):4699–4707.

177.LIN KH, ASHIZAWA K, CHENG SY. **Phosphorylation stimulates the transcriptional activity of the human beta 1 thyroid hormone nuclear receptor.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:7737–7741.

178. LIU Y, GAO WD, O'ROURKE B, MARBAN E. **Synergistic modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents by protein kinase C and adenosine. Implications for ischemic preconditioning.** *Circ Res.* 1996;78:443-454.

179.LOHRAY BB, BHUSHAN V, REDDY AS, RAO PB, REDDY N, HARIKISHORE P, HARITHA N, VIKRAMADITHYAN RK, CHKRABARTI R, RAJAGOPALAN R, KATNENI K. **Novel euglycemic and hypolipidemic agents. 4. pyridyl- and quinoliny- containing thiazolidinediones** *J Med Chem.* 1999; 42:2569-2581.

180.LOPEZ-RODRIGUEZ ML, VISO A, ORTEGA-GUTIERREZ S, LASTRES-BECKER I, GONZALEZ S, FERNANDEZ-RUIZ J, AND RAMOS JA. **Design, synthesis and biological evaluation of novel arachidonic acid derivatives as highly potent and selective endocannabinoid transporter inhibitors.** *J Med Chem.* 2001;44:4505–4508.

181.LYNN AB, HERKENHAM M. **Localisation of cannabinoid receptors and nonsaturable the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids.** *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;268:1612–1623.

182.MACCARRONE M, FINAZZI-AGRO A. **The endocannabinoid system. Cell Desystem, anandamide and the regulation of mammalian apoptosis.** *cell death Differ.* 2003;10:946–955.

183.MACKIE K, HILLE B. **Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:3825-3829.

184.MAEDA N, SHIMOMURA I, KISHIDA K, NISHIZAWA H, MATSUDA M, NAGARETANI H, FURUYAMA N, KONDO H, TAKAHASHI M, ARITA Y, KOMURO R, OUCHI N, KIHARA S, TOCHINO Y, OKUTOMI K, HORIE M, TAKEDA S, AOYAMA T, FUNAHASHI T, MATSUZA. **Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30.** *Nat Med.* 2002;(7):731-737.

185.MARBER MS, LATCHMAN DS, WALKER JM, YELLON DM. **Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction.** *Circulation.* 1993;88:1264-1272.

186.MATSUDA LA, LOLAIT SJ, BROWNSTEIN MJ, YOUNG AC, BONNER TI. **Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA.** *Nature.* 1990;346: 561-564.

187.MAZZARI S, CANELLA R, PETRELLI L, MARCOLONGO G, AND LEON A. **N-(2-hydroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation.** *Eur J Pharmacol.* 300: 227–236, 1996.

188.MBVUNDULA EC, RAINSFORD KD, BUNNING RA. **Cannabinoids in pain and inflammation.** *Inflammopharmacology.* 2004;12(2):99-114.

189.MECHOULAM R, BEN-SHABAT S, HANUS L, LIGUMSKY M, KAMINSKI NE, SCHATZ AR, GOPHER A, ALMOG S, MARTIN BR, COMPTON DR, PERTWEE RG, GRIFFIN G, BAYEWITCH M, BARG J, AND VOGEL Z. **Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors.** *Biochem Pharmacol.* 1995;50: 83–90.

190.MECHOULAM R, HANUS L, AND MARTIN BR. **Search for endogenous ligands of the cannabinoid receptor.** *Biochem Pharmacol.* 1994;48:1537– 1544.

191.MIMNAUGH EG, BONVINI P, NECKERS L. **The measurement of ubiquitin and ubiquitinated proteins.** *Electrophoresis.* 1999;20(2)418–428.

192.MIYAZAKI Y, GLASS L, TRIPLITT C, MATSUDA M, CUSI K, MAHANKALI A, MAHANKALI S, MANDARINO LJ, DEFRONZO RA. **Effect of rosiglitazone on glucose and non-esterified fatty acid metabolism in Type II diabetic patients.** *Diabetologia.* 2001 ;44(12):2210-2219

193.MIYAZAKI Y, MAHANKALI A, MATSUDA M, GLASS L, MAHANKALI S, FERRANNINI E, CUSI K, MANDARINO LJ, DEFRONZO RA. **Improved glycemic control and enhanced insulin sensitivity in type 2 diabetic subjects treated with pioglitazone.** *Diabetes Care.* 2001;24(4):710-719.

194.MIYAZAKI Y, MAHANKALI A, MATSUDA M, MAHANKALI S, HARDIES J, CUSI K, MANDARINO LJ, DEFRONZO RA. **Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(6):2784-2791.

- 195.MIYAZAKI Y, MATSUDA M, DEFRONZO RA. **Dose-response effect of pioglitazone on insulin sensitivity and insulin secretion in type 2 diabetes.** *Diabetes Care.* 2002;25(3):517-523.
- 196.MUNRO S, THOMAS KL, ABU-SHAAR M. **Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.** *Nature.* 1993;365:61-65.
- 197.MURAKAMI K, TOBE K, IDE T, MOCHIZUKI T, OHASHI M, AKANUMA Y, YAZAKI Y, KADOWAKI T. **A novel insulin sensitizer acts as a coligand for peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma: effect of PPARalpha activation on abnormal lipid metabolism in liver of Zucker fatty rats.** *Diabetes.* 1998;47:1841-1847.
- 198.MURRY CE, JENNINGS RB, REIMER KA. **Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.** *Circulation* 1986;74:1124-36.
- 199.NAGY L, TONTONOZ P, ALVAREZ JGA, CHEN H, EVANS RM. **Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma.** *Cell.* 1995;83:813-819.
- 200.NAHAS G. AND TROUVE R. **Effects and interactions of natural cannabinoids on the isolated heart.** *Proc Soc Exp Biol Med.* 1985;180:312-316.
- 201.NEMOTO S, RAZEGHI P, ISHIYAMA M, DE FREITAS G, TAEGTMEYER H, CARABELLO BA. **PPAR- $\gamma$  agonist**

**rosiglitazone ameliorates ventricular dysfunction in experimental chronic mitral regurgitation.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(1):H77-H82.

202.NARUMIYA S, FUKUSHIMA M. **Cyclopentenone prostaglandins: antiproliferative and antiviral actions and their molecular mechanism.** *Dev Oncol.* 1991;67:439-448.

203.NICHOLSON AC. **Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPARgamma signaling.** *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14(1):8-12.

204.NOMA A. **ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle.** *Nature* 1983;305:147-148.

205.NOLAN JJ, LUDVIK B, BEERDSEN P, JOYCE M, OLEFSKY J. **Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone.** *N Engl J Med.* 1994;331(18):1188-1193.

206.OBERFIELD JL, COLLINS JL, HOLMES CP, GOREHAM DM, COOPER JP, BLANCHARD SG, PARKS DJ, MOORE LB, LEHMANN JM, PLUNKET K, MILLER AB, MILBURN MV, KLIEWER SA, WILLSON TM. **A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:6102-6106.

207.OKAYA T, LENTSCH AB. **Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha regulates postischemic liver injury.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286(4):G606-G612.

208.OKUNO A, TAMEMOTO H, TOBE K, UEKI K, MORI Y, IWAMOTO K, UMESONO K, AKANUMA Y, FUJIWARA T, HORIKOSHI H, YAZAKI

Y, KADOWAKI T. **Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats.** *J Clin Invest.* 1998;101(6):1354-1361.

209.OLSCHEWSKI A, BRAU ME, OLSCHESKI H, HEMPELMANN G, VOGEL W. **ATP-dependent potassium channel in rat cardiomyocytes is blocked by lidocaine. Possible impact on the antiarrhythmic action of lidocaine.** *Circulation.* 1996;93:656-9.

210.O'ROURKE B. **Myocardial K(ATP) channels in preconditioning.** *Circ Res.* 2000;87:845-55.

211.OVIZE M, AUPETIT JF, RIOUFOL G, LOUFOUA J, ANDRE-FOUET X, MINAIRE Y, FAUCON G. **Preconditioning reduces infarct size but accelerates time to ventricular fibrillation in the pig heart.** *Am J Physiol.* 1995;269:H72-79.

212.OVIZE M, PRZYKLENK K, KLONER RA. **Preconditioning does not attenuate myocardial stunning.** *Circulation* 1992 ; 85 : 2247-54.

213.PARKS DJ, TOMKINSON NCO, VILLENEUVE MS, BLANCHARD SG, WILLSON TM. **Differential activity of rosiglitazone enantiomers at PPARgamma.** *Bioorg Med Chem Lett.* 1998;8:3657-3658.

214.PATRICELLI MP AND CRAVATT BF. **Fatty acid amide hydrolase competitively degrades bioactive amides and esters through a nonconventional catalytic mechanism.** *Biochemistry.* 1999;38:14125-14130.

215.PERTWEE RG. **Cannabinoid receptors and pain.** *Prog Neurobiol.* 2001;63:569-611.

216.PERROT S. **Cannabis: the analgesic and antiinflammatory medication of the future?** *Joint Bone Spine*. 2004;71(1):7-8.

217.PICARD F, AUWERX J. **PPAR(gamma) and glucose homeostasis.** *Annu Rev Nutr*. 2002;22:167-197.

218.PICKAVANCE L, WIDDOWSON PS, KING P, ISHII S, TANAKA H, WILLIAM S G. **The development of overt diabetes in young zucker diabetic fatty rats and the effect of chronic MCC-555 treatment.** *Br J Pharmacol*. 1998;125:767-770

219.PING P, ZHANG J, QIU Y, TANG XL, MANCHIKALAPUDI S, CAO X, BOLLI R. **Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms e and h in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity.** *Circ Res*. 1997;81:404-414.

220.PIOMELLI D, BELTRAMO M, GLASNAPP S, LIN SY, GOUTOPOULOS A, XIE XQ, AND MAKRIYANNIS A. **Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:5802–5807.

221.PORTER AC, SAUER JM, KNIERMAN MD, BECKER GW, BERNA MJ, BAO J, NOMIKOS GG, CARTER P, BYMASTER FP, LEESE AB, AND FELDER CC. **Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor.** *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301:1020–1024.

222.PRZYKLENK K, BAUER B, OVIZE M, KLONER RA, WHITTAKER P. **Regional ischemic preconditioning protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion.** *Circulation*. 1993;87:893-9.

223.PUDDU P, PUDDU GM, MUSCARI A. **Peroxisome proliferator-activated receptors: are they involved in atherosclerosis progression?** *Int J Cardiol*. 2003;90(2-3):133-40

224.RANDALL MD & KENDALL DA. **Involvement of a cannabinoid in endothelium-derived hyperpolarizing factor- mediated coronary vasorelaxation.** *Eur J Pharmacol*. 1997;335:205-209.

225.RANDALL MD. ALEXANDER SP, BENNETT T, BOYD EA, FRY JR, GARDINER SM, KEMP PA, MCCULLOCH AI & KENDALL DA. **An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant.** *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;229:114:120.

226.REDDY KA, LOHRAY BB, BHUSHAN V, REDDY AS, RAO MAMIDI NVS, REDDY NJ, SURYAPRAKASH A, MISRA P, VIKRAMADITHYAN RK, RAJAGOPALAN R. **novel antidiabetic and hypolipidemic agents. 5. hydroxyl versus benzyloxy containing chroman derivatives.** *J Med Chem*. 1999;42:32-65-3278.

227.REGGIO PH AND TRAORE H. **Conformational requirements for endocannabinoid interaction with the cannabinoid receptors, the anandamide transporter and fatty acid amidohydrolase.** *Chem Phys Lipids*. 2000;108: 15–35.

228.REGINATO MJ, BAILEY ST, KRAKOW SL, MINAMI C, ISHII S, TANAKA H, LAZAR MA. **A potent antidiabetic thiazolidinediones with**

**unique peroxisome proliferator-activated receptor gamma-activating properties.** *J Biol Chem.* 1998;273:32679-32684

229.RICHARDSON JD, AANONSEN L, HARGREAVES KM. **Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids.** *Eur J Pharmacol* 1998;345:144-153.

230.RICHARDSON JD, KILO S, HARGREAVES KM. **Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors.** *Pain.* 1998b(75):111-119.

231.RINALDI-CARMONA M, BARTH F, HEAULME M SHIRE D, CALANDRA B, CONGY C, MARTINEZ S, MARUANI J, NELIAT G, CAPUT D, ET AL. **SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor.** *FEBS Lett.* 1994;350:240-244.

232.RINALDI-CARMONA M, BARTH F, MILLAN J DEROCQ JM, CASELLAS P, CONGY C, OUSTRIC D, SARRAN M, BOUABOULA M, CALANDRA B, PORTIER M, SHIRE D, BRELIERE JC, LE FUR GL. **SR144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor.** *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;284: 644-650.

233.RIOUFOL G, OVIZE M, LOUFOUA J, ANDRÉ- FOUËT X, MINAIRE Y. **Ventricular fibrillation in preconditioned pig hearts : role of K<sup>+</sup> ATP channels.** *Am J Physiol* 1997;273:H2804-10.

234.RODRIGUEZ DE FONSECA F, NAVARRO M, GOMEZ R, ESCUREDO L, NAVA F, FU J, MURILLO-RODRIGUEZ E, GIUFFRIDA A, LOVERME J, GAETANI S, KATHURIA S, GALL C, AND PIOMELLI D. **An anorexic lipid mediator regulated by feeding.** *Nature.* 2001;414: 209-212.

235.ROSS, R.A., BROCKIE, H.C., STEVENSON, L.A., MURPHY, V.L., TEMPLETON, F., MAKRIYANNIS, A. & PERTWEE, R.G. **Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630.** *Br J Pharmacol.* 1999;126:665-672.

236.RUEDA D, GALVE-ROPERH I, HARO A, GUZMAN M. **The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase.** *Mol Pharmacol.* 2000;58:814–820.

237.RUMI MA, ISHIHARA S, KADOWAKI Y, ORTEGA-CAVA CF, KAZUMORI H, KAWASHIMA K, YOSHINO N, YUKI T, ISHIMURA N, KINOSHITA Y. **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent and -independent growth inhibition of gastrointestinal tumour cells.** *Genes Cells.* 2004;9(11):1113-1123.

238.SALADIN R, DE VOS P, GUERRE-MILLO M, LETURQUE A, GIRARD J, STAELS B, AUWERX J. **Transient increase in obese gene expression after food intake and insulin administration.** *Nature* 1995;377:527–529

239.SANCHEZ C, DE CEBALLOS ML, DEL PULGAR TG RUEDA D, CORBACHO C, VELASCO G, GALVE-ROPERH I, HUFFMAN JW, RAMON Y CAJAL S, GUZMAN M. **Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor.** *Cancer Res.* 2001;61:5784:5789.

240.SANCHEZ C, GALVE-ROPERH I, CANOVA C, BRACHET P, GUZMAN M. **Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells.** *FEBS Lett.* 1998;436: 6-10.

241. SATOH T, FURUTA K, SUZUKI M, WATANABE Y. **prostaglandin J<sub>2</sub> and its metabolites promote neurite outgrowth induced by nerve growth factor in PC12 cells.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;258:50-53.
242. SCHMIDT A, ENDO N, RUTLEDGE SJ, VOGEL R, SHINAR D, RODAN GA. **Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids.** *Mol Endocrinol.* 1992;6(10):1634-41.
243. SCHMID, P.C., SCHWARTZ, K.D., SMITH, C.N., KREBSBACH, R.J., BERDYSHEV, E.V. & SCHMID, H.H. **A sensitive endocannabinoid assay. The simultaneous analysis of N-acyl ethanolamines and 2-monoacylglycerols.** *Chem Phys Lipids.* 2000;104:185-191.
244. SCHOONJANS K, STAELS B, AUWERX J 1996 **Role of the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) in mediating effects of fibrates and fatty acids on gene expression.** *J Lipid Res.* 1996;37:907-925
245. SEARGENT JM, YATES EA, GILL JH. **GW9662, a potent antagonist of PPAR $\gamma$ , inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone, independently of PPAR $\gamma$  activation.** *Br J Pharmacol.* 2004;143(8):933-7.
246. SHAO D, RANGWALA SM, BAILEY ST, KRAKOW SL, REGINATO MJ, LAZAR MA. **Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR- $\gamma$ .** *Nature.* 1998;396(6709):377-380.
247. SHIBATA T, MATSUI K, NAGAO K, SHINKAI H, YONEMORI F, WAKITANI K. **Pharmacological profiles of a novel oral antidiabetic agent,**

**JTT-501, an isoxazolidinedione derivatice.** *Eur J Pharmacol.* 1999;364:211-219

248.SHIKI K, HEARSE DJ. **Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion-induced arrhythmias.** *American Journal of Physiology.* 1987;253:H1470-H1476.

249.SHINKAI H, ONOGI S, TANAKA M, SHIBATA T, IWAO M, WAKITANI K, UCHIDA I. **Isoxazolidine-3,5-dione and monocyclic 1,3-dicarbonyl compounds as hypoglycemic agents.** *J Med Chem.* 1998; 41:1927-1933

250.SIMOPOULOS AP. **Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. Prostaglandins, Leucotrienes Essent. Fatty Acids.** 1999;60:421-429

251.SLIPETZ DM, O'NEILL GP, FAVREAU L DUFRESNE C, GALLANT M, GAREAU Y, GUAY D, LABELLE M, METTERS KM. **Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase.** *Mol Pharmacol.* 1995;48: 352-361.

252.SMART D, GUNTHORPE MJ, JERMAN JC, NASIR S, GRAY J, MUIR AI, CHAMBERS JK, RANDALL AD & DAVIS JB. **The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1).** *Br J Pharmacol.* 2000;129:227-230.

253.SPEECHLY-DICK ME, MOCANU MM, YELLON DM. **Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat.** *Circ Res.* 1994;75:3586-90.

- 254.SOHDA T, MIZUNO K, KAWAMATSU Y. **Studies on antidiabetic agents. VI. Asymmetric transformation of ( $\pm$ )-5-(4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl)-2,4-thiazolidinedione (ciglitazone) with optically active 1-phenylethylamines.** *Chem Pharm Bull.* 1984;32:4460-4465.
- 255.STELLA N AND PIOMELLI D. **Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons.** *Eur J Pharmacol.* 2001;425:189-196.
- 256.STELLA N, SCHWEITZER P, AND PIOMELLI D. **A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation.** *Nature.* 1997;388:773-778.
- 257.STEPPAN CM, BAILEY ST, BHAT S, BROWN EJ, BANERJEE RR, WRIGHT CM, PATEL HR, AHIMA RS, LAZAR MA. **The hormone resistin links obesity to diabetes.** *Nature.* 2001;409:307-312
- 258.STRASSER RH, BRAUN-DULLAEUS R, WALENDZIK H, MARQUETANT R. **Alpha-1 receptor-independent activation of protein kinase C in acute myocardial ischemia.** *Circ Res.* 1992;70:1304-12.
- 259.STRAUS SE. **Immunoactive cannabinoids: therapeutic prospects for marijuana constituents.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:9363-9364.
- 260.SU CG, WEN X, BAILEY ST, JIANG W, RANGWALA SM, KEILBAUGH SA, FLANIGAN A, MURTHY S, LAZAR MA, WU GD. **A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response.** *J Clin Invest.* 1999;104(4):383-389.

261.SUGIURA T, KONDO S, SUKAGAWA A, NAKANE S, SHINODA A, ITOH K, YAMASHITA A, WAKU K. **2-arachidonylglycerol: a possible endogenous cannabionoid receptor ligand in brain.** *Biochem Biophys Res Comm.* 1995;215:89-97.

262.SUN JZ, TANG XL, KNOWLTON AA, PARK SW, QIU Y, BOLLI R. **Late preconditioning against myocardial stunning. An endogenous protective mechanism that confers resistance to postischemic dysfunction 24 hours after brief ischemia in conscious pigs.** *J Clin Invest.* 1995;95:388-403.

263.SUZUKI K, SAWA Y, KANEDA Y, ICHIKAWA H, SHIRAKURA R, MATSUDA H. **In vivo gene transfection with heat shock protein 70 enhances myocardial tolerance to ischemia- reperfusion injury in rat.** *J Clin Invest* 1997;99:1645-50.

264.TABERNERO A, SCHOONJANS K, JESEL L, CARPUSCA I, AUWERX J, ANDRIANTSITOHAINA R. **Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against myocardial ischaemic injury and improves endothelial vasodilatation.** *BMC Pharmacol.* 2002;2(1):10.

265.TACK CJ, ONG MK, LUTTERMAN JA, SMITS P. **Insulin-induced vasodilatation and endothelial function in obesity/insulin resistance. Effects of troglitazone.** *Diabetologia.* 1998;41(5):569-576.

266.TAKANO H, HASEGAWA H, ZOU Y, KOMURO I. **Pleiotropic actions of PPAR gamma activators thiazolidinediones in cardiovascular diseases.** *Curr Pharm Des.* 2004;10(22):2779-86.

267. TAMAS F. FREUND, ISTVAN KATONA, AND DANIELE PIOMELLI. **Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling.** *Physiol Rev.* 2003;83:1017–1066.

268. THEOCHARIS S, MARGELI A, VIELH P, KOURAKLIS G. **Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands as cell-cycle modulators.** *Cancer Treat Rev.* 2004;30(6):545-54.

269. THIEMERMANN C. **Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and heart failure.** *Br J Pharmacol.* 2004;142(6):1049-1051.

270. THIERINGER R, FENYK-MELODY JE, LE GRAND CB, SHELTON BA, DETMERS PA, SOMERS EP, CARBIN L, MOLLER DE, WRIGHT SD, BERGER J. **Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not inhibit IL-6 or TNF-alpha responses of macrophages to lipopolysaccharide in vitro or in vivo.** *J Immunol.* 2000;164(2):1046–1054.

271. THOMAS EA, CRAVATT BF, DANIELSON PE, GILULA NB, SUTCLIFFE JG. **Fatty acid amide hydrolase, the degradative enzyme for anandamide and oleamide, has selective distribution in neurons within the rat central nervous system.** *J Neurosci Res.* 1997;50: 1047- 1052.

272. THOMPSON GA. **The Regulation of Membrane Lipid Metabolism (2nd ed.).** Boca Raton. 1992;FL:CRC.

273. TONTONOZ P, HU E, GRAVES RA, BUDAVARI AI, SPIEGELMAN BM. **mPPAR $\gamma$ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer.** *Genes Dev.* 1994;8:1224–1234

274. TONTONOZ P, HU E, SPIEGELMAN B. **Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma.** *Curr Opin Genet Dev.* 1995;5:571–576.

275. TONTONOZ P, NAGY L, ALVAREZ J, THOMAZY VA, EVANS RM. **PPAR $\gamma$  promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL.** *Cell.* 1998;93:241–252.

276. TOYODA M, TAKAGI H, HORIGUCHI N, KAKIZAKI S, SATO K, TAKAYAMA H, MORI M. **A ligand for peroxisome proliferator activated receptor gamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human liver cancer cells.** *Gut.* 2002;50(4):563-567.

277. TSOU K, BROWN S, SANUDO-PENA MC, MACKIE K, WALKER JM. **Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system.** *Neuroscience.* 1998;83 393-411.

278. TSUBOUCHI Y, SANO H, KAWAHITO Y, MUKAI S, YAMADA R, KOHNO M, INOUE K, HLA T, KONDO M. **Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;270(2):400-405.

279. TUGWOOD JD, ISSEMANN I, ANDERSON RG, BUNDELL KR, MCPHEAT WL, GREEN S. **The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene.** *EMBO J.* 1992;11(2):433-9.

280. TWITCHELL W, BROWN S, MACKIE K. **Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons.** *J Neurophysiol.* 1997;78:43-50.

281. UEDA N, YAMAMOTO K, YAMAMOTO S, TOKUNAGA T, SHIRAKAWA E, SHINKAI H, OGAWA M, SATO T, KUDO I, INOUE K, TAKIZAWA H, NAGANO T, HIROBE M, MATSUKI N, AND SAITO H. **Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of arachidonylethanolamide, a cannabinoid receptor agonist.** *Biochim Biophys Acta.* 1995;1254: 127-134.

282. UPTON R, WIDDOWSON PS, ISHII S, TANAKA H, WILLIAMS G. **Improved metabolic status and insulin sensitivity in obese fatty Zucker rats and Zucker diabetic fatty rats treated with the thiazolidinediones, MCC-555.** *Br. J. Pharmacol.* 1998;125:1708-1714.

283. VALJENT E, PAGÈS C, ROGARD M, BESSON MJ, MALDONADO R, CABOCHE J.  **$\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission.** *Eur J Neurosci.* 2001;14: 342-352.

284. VARGA, K., LAKE, K., MARTIN, B.R. & KUNOS, G. **Novel antagonist implicates the CB1 cannabinoid receptor in the hypotensive action of anandamide.** *Eur J Pharmacol.* 1995;278:279-283.

285. VEGH A, KOMORI S, PAPP JG, SZEKERES L, PARRATT JR. **Antiarrhythmic effect of preconditioning in anesthetized dogs and rats.** *Cardiovasc Res.* 1992;26:487-92.

286. VERME JL, FU J, ASTARITA G, LA RANA G, RUSSO R, CALIGNANO A, PIOMELLI D. **The nuclear receptor peroxisome**

**proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide.** *Mol Pharmacol.* 2005;67(1):15-19.

287. VERRANDO P, NEGREL R, GRIMALDI P, MURPHY M, AILHAUD G. DIFFERENCIATION OF OB 17 PREADIPOCYTES TO ADIPOCYTES. **Triggering effects of clofenapate and indomethacin.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1981;663:255-265.

288. WALTER L, FRANKLIN A, WITTING A, WADE C, XIE Y, KUNOS G, MACKIE K, STELLA N. **Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration.** *J Neurosci.* 2003;23:1398-1405.

289. WANG P, GALLAGHER K, DOWNEY JM, COHEN MV. **Endothelin-1 limits myocardial infarction through PKC activation.** *J Mol Cell cardiol.* 1995;27:A44.

290. WARE MA, DOYLE CR, WOODS R, LYNCH ME, CLARK AJ. **Cannabis use for chronic non-cancer pain: results of a prospective survey.** *Pain.* 2003;102:211-216.

291. WHITE, R. & HILEY, C.R. **Endothelium and cannabinoids receptor involvement in levcromakalim vasorelaxation.** *Eur J Pharmacol.* 1997;339:157:160.

292. WHITE, R., HO, W.-S.V., BOTTRILL, F.E., FORD, W.R. & HILEY, C.R. **Mechanisms of anandamide-induced vasorelaxation in rat isolated coronary arteries.** *Br J Pharmacol.* 2001;134:921-929.

293. WILLSON TM, BROWN PJ, STERNBACH DD, HENKE BR. **The PPARs: from orphan receptors to drug discovery.** *Med Chem.* 2000;43(4):527-50.

294. WILLSON TM, COBB JE, COWAN DJ, WIETHE RW, CORREA ID, PRAKASH SR, BECK KD, MOORE LB, KLIEWER SA, LEHMAN JM. **The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the anti-hyperglycemic activity of thiazolidinediones.** *J Med Chem.* 1996;39:665-668.

295. WU L, WANG R, DE CHAMPLAIN J, WILSON TW. **Beneficial and deleterious effects of rosiglitazone on hypertension development in spontaneously hypertensive rats.** *Am J Hypertens.* 2004;17(9):749-56.

296. XU HE, LAMBERT MH, MONTANA VG, PARKS DJ, BLANCHARD SG, BROWN PJ, STERNBACH DD, LEHMANN JM, WISELY GB, WILLSON TM, KLIEWER SA, MILBURN MV. **Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors.** *Mol Cell.* 1999;3:397-403

297. XU W, LIU Y, WANG S, MCDONALD T, VAN EYK JE, SIDOR A, AND O'ROURKE B. **Cytoprotective role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the cardiac inner mitochondrial membrane.** *Science (Wash DC).* 2002;298:1029-1033.

298. YANG WL, FRUCHT H. **Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells.** *Carcinogenesis.* 2001;22(9):1379-1383.

299. YANG XY, WANG LH, CHEN T, HODGE DR, RESAU JH, DASILVA L, W.L. FARRAR WL. **Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT.** *J Biol Chem.* 2000;275(7):4541–4544.

300. YELLON DM, DOWNEY JM. **Preconditioning at the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology.** *Physiol Rev.* 2003;83:1113-1151.

301. YKI-JARVINEN H. **Thiazolidinediones.** *N Engl J Med.* 2004;351(11):1106-18.

302. YOUNG PW, BUCKLE DR, CANTELLO BCC, CHAPMAN H, CLAPHAM JC, COYLE PJ, HAIGH D, HINDLEY RM, HOLDER JC, KALLENDER H, LATTER AJ, LAWRIE KWM, MOSSAKOWSKA D, MURPHY GJ, COX LR, SMITH SA. **Identification of high-affinity binding sites for the insulin sensitizer rosiglitazone (BRL-49653) in rodent and human adipocytes using a radioiodinated ligand for peroxisomal proliferator-activated receptor gamma.** *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;284:751-759.

303. YTREHUS K, LIU Y, DOWNEY JM. **Preconditioning protects the ischemic rabbit heart by protein kinase C activation.** *Am J Physiol.* 1994;266:H1145-H1152.

304. YUE TL, BAO W, JUCKER BM, GU JL, ROMANIC AM, BROWN PJ, CUI J, THUDIUM DT, BOYCE R, BURNS-KURTIS CL, MIRABILE RC, ARAVINDHAN K, OHLSTEIN EH. **Activation of peroxisome proliferator-**

**activated receptor-alpha protects the heart from ischemia/reperfusion injury.** *Circulation.* 2003;108(19):2393-2399.

305.YUE TL. **Cardioprotective effects of thiazolidinediones, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists.** *Drugs Today (Barc).* 2003;39(12):949-960.

306. ZHANG B, BERGER J, ZHOU G, ELBRECHT A, BISWAS S, WHITE-CARRINGTON S, SZALKOWSKI D, MOLLER DE. **Insulin- and mitogenactivated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma.** *J Biol Chem.* 1996;271(50):31771–31774.

307.ZHANG Y, IRWIN MG, WONG TM. **Remifentanyl preconditioning protects against ischemic injury in the intact rat heart.** *Anesthesiology.* 2004;101(4):918-923.

308.ZIMMER A, ZIMMER AM, HOHMANN AG, HERKENHAM M, BONNER TI. **Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:5780-5785

309.ZYGMUNT PM, PETERSSON J, ANDERSSON DA, CHUANG H, SORGARD M, DI MARZO V, JULIUS D & HOGESTATT ED. **Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide.** *Nature.* 1999 ;400 :452-457.

310.<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/6780/PPARS.pdf>