

Université de Montréal

**Rôle de la ghréline dans la régulation du coactivateur
transcriptionnel PGC-1 α**

par

Sarah Keil

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences
en Biochimie

Décembre 2013

© Sarah Keil, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Rôle de la ghréline dans la régulation du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α

Présenté par :
Sarah Keil

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr James Omichinski, président-rapporteur
Dr André Tremblay, directeur de recherche
Dr Geneviève Mailhot, membre du jury

RÉSUMÉ

L'adaptation de l'organisme à son environnement est essentielle à sa survie. L'homéostasie énergétique permet l'équilibre entre les apports, les dépenses et le stockage d'énergie. Un surplus calorique important dérègle ce processus et mène au développement du syndrome métabolique caractérisé, entre autres, par une obésité, un diabète de type II, des maladies cardiovasculaires et des dyslipidémies. La ghréline participe au maintien de l'équilibre énergétique durant le jeûne en stimulant la production de glucose par le foie et le stockage lipidique dans le tissu adipeux. Le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α , surexprimé en situation de jeûne, est impliqué dans l'induction de la production de glucose par le foie et l'oxydation des acides gras. Notre hypothèse est que ces deux acteurs clés du métabolisme énergétique constituent un axe de régulation commun.

Dans cette étude, nous montrons que la ghréline participe à la régulation de PGC-1 α . Son récepteur GHS-R1a, possédant une forte activité constitutive, est également impliqué de façon indépendante au ligand. GHS-R1a réduit l'activité transcriptionnelle de PGC-1 α tandis que l'ajout du ligand inverse modérément cette action. L'effet de GHS-R1a corrèle avec l'acétylation de PGC-1 α qui est fortement augmentée de façon dose-dépendante. La stabilité de PGC-1 α est également augmentée par le GHS-R1a indépendamment de l'ubiquitine. La ghréline diminue la capacité de PGC-1 α à lier PPAR β , un récepteur nucléaire partenaire de PGC-1 α . De plus, la ghréline réduit, de façon ligand-dépendante, la capacité de coactivation de PGC-1 α sur PPAR β dans les hépatocytes. L'ensemble de ces résultats identifie PGC-1 α comme cible du signal de la ghréline et suggère un axe de régulation ghréline/PGC-1 α /PPAR β . Une meilleure compréhension de cet axe de régulation va permettre la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques pour faire face aux pathologies associées au syndrome métabolique.

Mots-clés : PGC-1 α , PPAR β , GHS-R1a, ghréline, récepteurs nucléaires, coactivateur transcriptionnel, syndrome métabolique

ABSTRACT

The adaptation of an organism to its environment is essential to its survival. Energy homeostasis is defined as the balance between intakes, expenses and storage of energy. An excess of calories disrupts this process and leads to the development of the metabolic syndrome that is characterized by obesity, type II diabetes, cardiovascular diseases and dyslipidemia. During fasting, ghrelin participates in the maintenance of energy balance by stimulating hepatic production of glucose and lipid storage in adipose tissue. The transcriptional coactivator PGC-1 α is overexpressed in the liver during fasting and is involved in the induction of the hepatic glucose production and fatty acid oxidation. Our hypothesis is that these two key performers in the energy metabolism constitute a common axis control.

In this study, we show that ghrelin plays a role in the regulation of PGC-1 α . The ghrelin receptor GHS-R1a is also involved because of its strong constitutive activity in absence of ligand. We found that GHS-R1a inhibited PGC-1 α transcriptional activity whereas adding ghrelin to cells moderated this effect. PGC-1 α activation by GHS-R1a correlated with a dose-dependent increase of PGC-1 α acetylation. The stability of PGC-1 α was also increased by ghrelin receptor in a manner involving the ubiquitin-independent proteasome pathway. Ghrelin decreased the ability of PGC-1 α to bind to PPAR β , one of its nuclear receptor partners. Furthermore, ghrelin decreased the ability of PGC-1 α to coactivate PPAR β in a ligand-dependent manner in hepatocytes. Together, these results identify PGC-1 α as a metabolic target of GHSR-1a signaling and defines a new regulatory axis involving ghrelin/PGC-1 α /PPAR β in hepatocytes. A better understanding of this regulation axis will provide novel aspects in therapeutic targeting of diseases associated with the metabolic syndrome.

Keywords : PGC-1 α , PPAR β , GHS-R1a, ghrelin, nuclear receptors, transcriptional coactivator, metabolic syndrome

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
REMERCIEMENTS	xiii
1 INTRODUCTION	15
1.1 L'homéostasie énergétique.....	16
1.2 La ghréline	17
1.2.1 Le récepteur de la ghréline : GHS-R1a.....	18
1.2.1.1 Structure	18
1.2.1.2 Distribution	19
1.2.1.3 Signalisation.....	20
1.2.1.4 Activité constitutive	22
1.2.2 Identification de la ghréline	23
1.2.3 Synthèse et structure de la ghréline.....	24
1.2.4 Activités biologiques de la ghréline	26
1.2.4.1 Effets neuroendocrines.....	27
1.2.4.2 Effets orexigéniques.....	27
1.2.4.3 Effets sur le métabolisme énergétique	28
1.2.5 Modèles animaux	30
1.3 La régulation génique.....	30
1.3.1 Les récepteurs nucléaires	30
1.3.2 Les cofacteurs.....	32
1.4 Le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α	34
1.4.1 Structure de PGC-1 α	35

1.4.2	Régulation de PGC-1 α	36
1.4.2.1	Régulation transcriptionnelle	36
1.4.2.2	Modifications post-traductionnelles.....	38
1.4.2.2.1	Acétylation	39
1.4.2.2.2	Phosphorylation.....	42
1.4.2.2.3	Ubiquitination.....	44
1.4.3	Fonctions de PGC-1 α dans la régulation de l'expression génique	45
1.4.3.1	La thermogénèse adaptative.....	47
1.4.3.2	Le métabolisme des acides gras	48
1.4.3.3	Le métabolisme du glucose.....	49
1.4.3.4	Détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	49
1.4.4	Partenaires de PGC-1 α	51
1.4.4.1	Peroxisome proliferator-activated receptor β (PPAR β)	52
1.4.4.2	Interaction PGC-1 α /PPAR β	53
1.5	Hypothèse et objectifs	55
2	MATÉRIEL ET MÉTHODES	56
2.1	Culture cellulaire.....	57
2.2	Analyses par immunoprécipitation et Western blot.....	57
2.3	Test de stabilité protéique	59
2.4	Test d'activité transcriptionnelle.....	60
3	RESULTATS.....	61
3.1	La ghréline et son récepteur GHS-R1a modulent l'activité transcriptionnelle de PGC-1 α	62
3.2	Le récepteur GSH-R1a induit l'acétylation de PGC-1 α	64
3.3	L'activité constitutive du récepteur de la ghréline protège PGC-1 α d'une dégradation indépendante de l'ubiquitination.....	67
3.4	La ghréline diminue l'interaction PGC-1 α /PPAR β et réduit la capacité de coactivation de PGC-1 α envers PPAR β	72

4	DISCUSSION	75
4.1	Implication du récepteur GHS-R1a et de la ghréline dans la régulation de PGC-1 α	77
4.1.1	Rôle de GHSR-1a dans la régulation de PGC-1 α	77
4.1.2	Rôle de la ghréline dans l'activation de PGC-1 α	79
4.2	Implication de la ghréline dans la coactivation de PPAR β via PGC-1 α	83
4.2.1	La ghréline et l'intéraction PGC-1 α /PPAR β	83
4.2.2	La ghréline et la capacité de coactivation de PGC-1 α envers PPAR β	84
4.2.3	Effet de la ghréline sur le couplage PGC-1 α /PPAR β	86
5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	89
	BIBLIOGRAPHIE	i
	ANNEXES.....	xvii

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure de la ghréline humaine acylée	17
Figure 2. Représentation serpentine et hélicale du GHS-R1a.....	19
Figure 3. Signalisation classique de GHS-R1a en présence de ligand.....	21
Figure 4. Synthèse de la ghréline	25
Figure 5. Fonctions biologiques principales de la ghréline.....	26
Figure 6. Complexes coactivateurs et corépresseurs nécessaires à la régulation transcriptionnelle via les récepteurs nucléaires.....	33
Figure 7. Structure du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α	35
Figure 8. Régulation post traductionnelle de PGC-1 α	38
Figure 9. Régulation de l'acétylation/désacétylation de PGC-1 α	42
Figure 10. Mécanisme d'action de PGC-1 α sur le promoteur de ses gènes cibles	46
Figure 11. Différents rôles de PGC-1 α dans le muscle, le foie et le tissu adipeux brun	51
Figure 12. La ghréline active PGC-1 α tandis que GHS-R1a l'inactive.....	63
Figure 13. GHS-R1a induit l'acétylation de PGC-1 α	65
Figure 14. L'acétylation de PGC-1 α n'est pas modulée par la ghréline.....	66
Figure 15. GHS-R1a et GCN5 engendrent l'accumulation de PGC-1 α	68
Figure 16. GHS-R1a stabilise PGC-1 α	69
Figure 17. L'ubiquitination de PGC-1 α n'est pas modulée par la ghréline ou son récepteur	71
Figure 18. La ghréline réduit l'interaction PCG-1 α /PPAR β	73
Figure 19. La ghréline réduit la capacité de PGC-1 α à coactiver PPAR β de façon ligand-dépendante.....	74
Figure 20. Modèle préliminaire de la régulation de PGC-1 α par la ghréline et GHS-R1a.	82

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACC2	acetyl-CoA carboxylase 2
ACL	ATP citrate lyase
ACTH	adrenocorticotropic hormone
ADN	acide désoxyribonucléique
AF	fonction d'activation
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide
AMP	adénosine monophosphate
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
AMPK	kinase activée par l'AMP
AR	récepteurs adrénergiques
ARN	acide ribonucléique
AROS	active regulator of SIRT1
ATF2	activating transcription factor 2
ATP	adénosine triphosphate
Ca ²⁺	calcium
CaMKIV	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase IV
CB1	cannabinoïde de type 1
CBP/p300	CREB binding protein/p300
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator 2
CnA	calcineurin A
CPT-1	carnitine palmitoyl transferase 1
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
CtBP	C-terminal Binding Protein
DAG	diacylglycérol
DBC1	deleted in breast cancer 1

DBD	domaine de liaison à l'ADN
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DRIP205	vitamin D receptor-interacting protein 205
EDTA	acide éthylène diamine tétra acétique
ER	récepteur des estrogènes
Erk	kinase régulée par un signal extracellulaire
ERR	estrogen-related receptor
FAS	synthétase des acides gras
FBS	sérum bovin foetal
foxO	forkhead box class-O
FXR	farnesoid X receptor
G6-Pase	glucose-6-phosphatase
GH	hormone de croissance
GHRH	hormone libératrice de l'hormone de croissance ou somatolibérine
GHRP	peptide sécréteur de l'hormone de croissance
GHS	sécrétine de l'hormone de croissance
GHS-R1	récepteur des sécrétines de l'hormone de croissance de type 1
GlcNAc	beta-N-acetylglucosamine
GLUT4	Glucose transporter type 4
GOAT	O-acétyltransférase de la ghréline
GPCR	récepteur couplé aux protéines G
GR	récepteur des glucocorticoïdes
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
h	heures
HA	hémagglutinine
HAT	acétyltransférase des histones
HEK293	cellules embryonnaires humaines du rein
HepG2	cellules d'hépatome humain
HNF4	human nuclear factor 4

IP ₃	inositol 1,4,5-triphosphate
IRS-1	substrat 1 du récepteur de l'insuline
KOH	hydroxyde de potassium
L	leucine/domaine riche en leucine
LBD	domaine de liaison du ligand
LH	hormone lutéinisante
LXR	liver X receptor
M	molaire
MAPK	protéine kinase activée par les mitogènes
MBOATs	O-acétyltransférases liées à la membrane
MCAD	medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase
MEF2	myogenic transcription factors myocyte enhancer factor 2
mg	milligramme
mm	millimètres
mM	millimolaire
mtTFA	mitochondrial transcription factor A
Na ₃ VO ₄	orthovanadate de sodium
NaCl	chlorure de sodium
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide (agent d'oxydation)
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide (agent de réduction)
NaF	fluorure de sodium
NAM	nicotinamide
NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase
NCoR	répresseur du récepteur nucléaire
NEM	N-éthylmaleimide
NOS	synthétase de l'oxyde nitrique
NPY	neurones à neuropeptide Y
NQO1	flavoprotein NADH quinone oxidoreductase 1
NRF	nuclear respiratory factors

OXPHOS	phosphorylation oxydative
PBS	Phosphate-buffered saline
PDK	pyruvate dehydrogenase kinase
PEPCK	phosphoénolpyruvate carboxykinase
PEI	agent polycationique polyéthylènimine
PGC-1	peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1
PI3-K	phosphoinositide 3-kinase
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyl
PPAR	récepteur activé par les proliférateurs des peroxisomes
PPRE	élément de réponse à PPAR
PR	récepteur de la progestérone
PRC	PGC-1 α related coactivator
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RRM	domaine de reconnaissance et de liaison à l'ARN
RS	domaine riche en résidus arginine et sérine
RXR	<i>retinoic X receptor</i>
S6K	S6 kinase
SCFCdc4	Skp1/Cullin/F-box-cell division control 4
SDS	dodécylsulfate de sodium
SEM	erreur standard à la moyenne
Sirt	sirtuin
SMRT	médiateur silencieux des rétinoïdes et de l'hormone thyroïdienne
SOD1	superoxide dismutase
SRC	steroid receptor coactivator
SUMO	small ubiquitin-like modifier
TBS	Tris-buffered saline

tk	thymidine kinase
TORC2	transducer of regulated CREB activity 2
TRAP	thyroid receptor-associated protein
TRIS	trishydroxyméthylaminométhane
TSA	trichostatine A
UAS	séquence d'activation en amont
UCP	uncoupling protein
X	acide aminé quelconque

*« S'il n'y a pas eu de question, il ne peut y
avoir connaissance scientifique. Rien ne va
de soi. Rien n'est donné. Tout est construit »*

Gaston Bachelard

REMERCIEMENTS

Mon parcours est assez atypique mais au travers de mes expériences professionnelles, la recherche finit toujours par me ramener à elle. A moins que ce soit moi qui me tourne vers elle... Ces deux années de recherche ont été une formidable expérience. Malheureusement, deux ans passent très vite (encore plus dans la recherche!) et pour les terminer comme il se doit, je tiens à remercier toutes les personnes sans qui cette expérience n'aurait pas été aussi enrichissante.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, André Tremblay, pour m'avoir donné l'opportunité de prendre en charge ce projet au sein de ton laboratoire. Merci pour la confiance que tu m'as accordé et pour ton aide précieuse tout au long de ma maîtrise.

Je remercie ensuite mes collègues qui ont partagé mon quotidien au laboratoire. Merci à Samira Benhadjeba et Lydia Edjekouane. Merci à Karine Sauvé, pour ta mémoire infailible, ta disponibilité quand il s'agit de répondre aux questions ou de rendre service et pour ton expérience que tu fais partager avec plaisir. Merci à Véronique Caron, ma voisine de bench. C'est à toi que je dois mes premiers pas dans le lab. Tu as toujours été de bon conseil pour mon troubleshooting et je t'en suis reconnaissante. Et enfin un grand merci à toi, Stéphanie Bilodeau, ma copine de thé (et de galère?). Grâce à toi j'ai vite développé mes capacités à comprendre l'accent du Québécoisquiparlevite. Comment résumer ces deux ans en quelques lignes? Beaucoup de taquinerie, énormément de soutien (niveau moral ou niveau manip'), une dose de bonne humeur (pas toujours), des 4 à 6 bien remplis (au lab), des 5 à 7 mouvementés (ailleurs) et une pincée de chocolat!! Merci beaucoup miss pour tous ces moments... Je vais m'ennuyer de toi c'est sûr!! Qui va me lire la citation de chaque début de mois?

Merci également à Fabien et Stéphanie, nos voisins de lab. Fabien, pour tes chialages de Français au quotidien et ta sympathie. Stéphanie pour tes conseils des derniers

mois. Merci aussi à Hannah pour ta contribution au projet, ta bonne humeur et... tes innombrables questions (bien qu'elles aient été chronophages).

Je tiens à souligner la gentillesse et la disponibilité des membres de la CHU Ste-Justine avec lesquels j'ai eu l'occasion d'échanger.

Merci également à mon amie de longue date, Noémie (alias Nono). Simplement pour ta présence dans ma vie et ton amitié. C'est dur de vivre loin de toi...

Je n'oublie pas non plus mes parents. Même si pour vous la biologie est une « science mystère » et que mon projet vous parle peu (ou de loin), c'est grâce à vous que je suis arrivée jusqu'ici. Merci beaucoup. Vous avez toujours été d'un bon soutien depuis le début de ma maîtrise comme depuis toujours. Quand « on y croit » on y arrive, n'est ce pas papa? Merci aussi à mon frère, Florian, sans qui je ne me serais peut être pas orientée vers des études scientifiques.

Et évidemment, merci à mon Amour, Cédric. C'est grâce à toi que j'ai découvert la vie à Montréal. C'est un vrai plaisir de partager ta vie au quotidien. Ton soutien sans failles m'a été précieux.

1 INTRODUCTION

1.1 L'homéostasie énergétique

Depuis l'origine de la vie, les organismes vivants doivent s'adapter constamment à leur environnement pour assurer leur survie; que se soit face au climat, aux agents pathogènes ou aux ressources nutritionnelles. Les premiers concepts d'homéostasie datent des années 1840, durant lesquelles les études du médecin et physiologiste Claude Bernard, sur le fonctionnement de l'organisme, révèlent l'existence d'un « milieu intérieur » permettant de conserver un équilibre avec l'extérieur (Bernard 1966). Ce principe s'applique également à l'énergie, essentielle au maintien de la vie. L'homéostasie énergétique est alors le processus qui permet l'équilibre entre la consommation, le stockage et la dépense calorique au sein de l'organisme.

La variation des apports nutritionnels évolue au cours de la journée et des saisons. L'organisme doit faire face efficacement aux moments de festin comme aux périodes de famine. Dans les pays développés, où l'alimentation est de plus en plus grasse et sucrée, le corps tente également de s'adapter aux excès à long terme. Malheureusement, ce système n'est pas infallible et trop d'excès mènent à des pathologies telles que l'obésité et le diabète de type II qui caractérisent le syndrome métabolique.

Lors du jeûne, l'organisme est en balance énergétique négative. Il est alors nécessaire de protéger les organes dépendant du glucose (substrat énergétique très peu stocké) en maintenant une glycémie optimale. Le foie joue un rôle très important dans ce processus puisqu'il est responsable, dans un premier temps, de l'augmentation de la glycogénolyse hépatique (dégradation du glycogène) puis, dans un deuxième temps, de l'augmentation de la gluconéogenèse hépatique (production de glucose à partir de lactate, glycérol ou acides aminés). En parallèle, les acides gras (substrat majoritairement stocké) vont devenir les principales sources énergétiques (augmentation de l'oxydation des acides gras). La régulation de cette adaptation est majoritairement hormonale. Elles jouent le rôle

de signaux et induisent les voies de signalisation intracellulaires appropriées dans les tissus concernés. La régulation d'expression des gènes qui codent pour des protéines impliquées dans les voies métaboliques fait partie des modes de contrôle de ces hormones.

1.2 La ghréline

La ghréline est un peptide naturel de 28 acides aminés sécrété par l'estomac lors du jeûne (**Figure 1**). Elle est connue pour stimuler la prise alimentaire mais cette hormone joue également un rôle important sur la régulation du métabolisme énergétique. Cette section présente son récepteur, sa découverte inattendue, sa structure particulière et ses fonctions diverses.

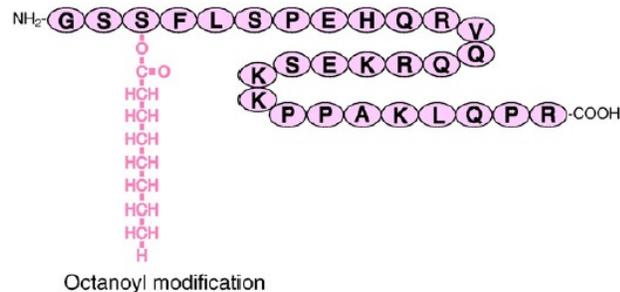


Figure 1. Structure de la ghréline humaine acylée

Extrait de (Kojima 2008).

1.2.1 Le récepteur de la ghréline : GHS-R1a

L'histoire de la ghréline débute en 1996, par le clonage de son récepteur *Growth Hormone Secretagogue-receptor* (GHS-R) (Howard et al. 1996). Dans les années 70, les recherches d'analogues d'opiacé mènent à la découverte de la première sécrétine de l'hormone de croissance (GHS) (Bowers et al. 1980). Il s'agit d'un composé synthétique (dérivé d'opiacé) capable de provoquer la sécrétion de l'hormone de croissance (GH) dans l'hypophyse, sans avoir d'activité opiacée. Par la suite, la création de composés analogues plus stables et plus efficaces a été réalisée. Grâce aux recherches effectuées sur le mécanisme d'action de ces composés dans l'hypophyse, il s'est avéré que la voie de signalisation de ces composés était différente de la voie de la somatolibérine (peptide endogène responsable de la sécrétion d'hormone de croissance), supposant ainsi deux types de récepteurs différents (Smith et al. 1997). S'engage ensuite la recherche de ce GHS-R dont l'activation provoque une augmentation du calcium intracellulaire. C'est grâce à une approche de criblage de banque d'ARNc de l'hypophyse, dans des œufs de *Xenopus*, que l'identification de GHS-R a été possible. La stimulation était effectuée avec une GHS puis l'augmentation du calcium intracellulaire était mesurée via l'aequorine (protéine luminescente sensible au calcium) (Howard et al. 1996).

1.2.1.1 Structure

L'analyse de l'ARNm identifié a révélé une structure de récepteur à 7 domaines transmembranaires et lié aux protéines G (GPCR) (Howard et al. 1996). Les GPCRs forment une superfamille de protéines largement représentée dans le génome qui compose 5 grandes familles. GSH-R1a appartient à la famille A de type rhodopsine caractérisée par un domaine N-terminal court et certains motifs d'acides aminés conservés. Par homologie, le récepteur de la ghréline partage 52 % de sa séquence avec le récepteur de la motiline (Feighner et al. 1999). Le pré-ARNm de GHS-R code pour deux isoformes, GHS-R1a et GHS-R1b, issues de l'épissage alternatif. La protéine GHS-R1a est composée de 366 acides aminés (**Figure 2**).

1.2.1.3 Signalisation

La liaison de la ghréline à son récepteur induit la signalisation cellulaire. Après 20 minutes, le récepteur est rapidement phosphorylé et le recrutement des β -arrestines à la place des protéines G induit la désensibilisation (Camina et al. 2004). GHS-R1a est par la suite internalisé avec son ligand. Une fois dans les endosomes, la ghréline est dégradée. (Pantel et al. 2006). Le récepteur est ensuite recyclé lentement à la membrane. Le nombre de GHS-R1a exposé à la surface revient à son niveau basal après 3 à 6 heures (Camina et al. 2004). Il a été démontré que la formation du complexe stable de GHS-R1a avec les β -arrestines peut induire une voie de signalisation alternative du récepteur (Camina et al. 2007).

Les différentes voies de signalisation du récepteur GHS-R1a engendrées par la liaison de son ligand semblent tissu-spécifiques. La première voie de signalisation identifiée dans les cellules de l'hypophyse correspond à une voie classique des GPCRs (**Figure 3**) (Adams et al. 1995, Lei et al. 1995, Chen et al. 1996). GHS-R1a est couplé avec les protéines $G_{\alpha q11}$. En présence du ligand, le récepteur active les protéines $G_{\alpha q11}$ qui activent la phospholipase C_{β} (PLC_{β}) et engendre la production des messagers secondaires inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG). L'augmentation d' IP_3 induit l'augmentation du calcium dans le cytosol qui permet la translocation de la protéine kinase C (PKC) à la membrane plasmique où elle est activée par sa liaison avec le calcium et sa phosphorylation par DAG. L'élévation de la concentration du calcium intracellulaire stimule la sécrétion de GH (Herrington et al. 1994).

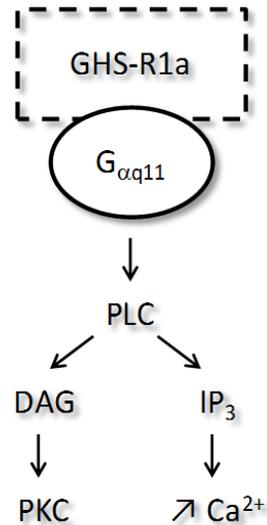


Figure 3. Signalisation classique de GHS-R1a en présence de ligand

Par la suite, de nombreuses autres études ont révélé différentes voies de signalisation selon les types cellulaires pouvant faire intervenir d'autres récepteurs. Par exemple, l'hétérodimérisation de GHS-R1a et du récepteur cannabinoïde de type 1 (CB1) a été rapportée dans l'hypothalamus (Kola et al. 2008, Alen et al. 2013, Lim et al. 2013). Dans les cellules β du pancréas, la transduction du signal est effectuée via la sous-unité $G_{\alpha i2}$ (Dezaki et al. 2007). Dans le foie, c'est la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3-K)/AKT qui est impliquée (Murata et al. 2002). Les voies des MAPKs peuvent également être activées comme par exemple dans les adipocytes (Lodeiro et al. 2009) et les cellules de la glande surrénale (Mazzocchi et al. 2004). Cette voie des MAPKs semble être la voie alternative stimulée par les β -arrestines dans les cellules de rein humain HEK293 (Holliday et al. 2007).

1.2.1.4 Activité constitutive

La plupart des GPCRs ont été décrits comme possédant une activité constitutive, c'est-à-dire qu'ils peuvent être dans un état actif et engendrer un signal en absence de leur ligand (Costa et al. 2005). D'après une étude effectuée dans les cellules HEK293 transfectées, l'augmentation du messager secondaire IP_3 en absence de ligand représente 50 % de l'activité totale de GHS-R1a (Holst et al. 2003). Les domaines et résidus impliqués dans cette activité basale ont été identifiés (Holst et al. 2004) (Schwartz et al. 2006). L'activité constitutive est estimée à 40 % de l'activité maximale dans un système *in vitro* de disque lipidique (Damian et al. 2012). Ces résultats ont également été confirmés *in vivo*, dans l'hypothalamus, grâce à l'administration d'un antagoniste (Petersen et al. 2009). Les voies de signalisation par lesquelles GHS-R1a transmet son signal en absence de ligand n'ont pas encore été identifiées. Néanmoins, il semblerait que la transduction du signal soit différente selon la présence ou non du ligand. Par exemple, dans les cellules HEK293 transfectées avec le vecteur d'expression du GHS-R1a, l'activation des voies des MAPKs n'est pas observée en absence de son ligand (Chu et al. 2007).

L'activité constitutive de GHS-R1a est régulée selon son expression à la surface de la membrane plasmique. Ce récepteur détient la capacité de s'internaliser en absence de son ligand, contrairement à d'autres GPCRs constitutivement actifs (Holst et al. 2003). Ce phénomène n'est cependant pas comparable à l'internalisation du récepteur en présence de ghréline. Effectivement, en absence de ligand, les GHS-R1a endocytés ne sont pas phosphorylés et ne recrutent pas les β -arrestines (Mary et al. 2012). Le recrutement des β -arrestines de façon ligand-dépendante explique pourquoi la voie des MAPKs n'est pas activée en absence de ghréline. L'internalisation est indépendante de l'environnement cellulaire puisqu'elle se produit également dans un système *in vitro* de disque lipidique. (Damian et al. 2012).

L'implication physiologique de l'activité constitutive de GHS-R1a n'est pas encore bien comprise. Il s'avère que les lignées de souris qui possèdent une invalidation totale

pour le gène *Ghs-r1a* (*Ghs-r1a*^{-/-}) ont un phénotype comparable à celui des souris sauvages. Afin de mieux comprendre le rôle de GHS-R1a, une approche alternative intéressante est l'identification, chez l'homme, de mutations naturelles grâce à une analyse génétique. La caractérisation au niveau cellulaire de ces mutations permettra d'en comprendre l'effet sur l'activité de GHS-R1a ligand-dépendante ou non. Ainsi une mutation de deux familles avec un phénotype de petite taille a permis de révéler l'importance de l'activité constitutive du récepteur de la ghréline dans la croissance (Pantel et al. 2006). D'une façon générale, GHS-R1a est un récepteur dont la signalisation est tissu-spécifique. Son activité constitutive lui confère une importance capitale dans la transmission et la régulation de l'action de la ghréline.

L'isoforme 1b, formée des 5 premiers domaines transmembranaires, est quant à lui exprimé de façon ubiquitaire. Le récepteur GHS-R1b ne lie pas la ghréline et ne possède pas d'activité de signalisation (Howard et al. 1996). Cependant, il détient la capacité de former un hétérodimère avec GHS-R1a. Il a été démontré dans les cellules HEK293 transfectées que la présence de GHS-R1b réduit l'activité constitutive de GHS-R1a en réduisant son expression à la surface de la cellule (Chow et al. 2012).

1.2.2 Identification de la ghréline

A la fin des années 90, l'équipe du Dr Kenji Kangawa débute leur projet de recherche du ligand endogène du récepteur GHS-R1a (Kojima 2008). Pour atteindre leurs objectifs, les auteurs ont mis au point un système basé sur la mesure du calcium intracellulaire de cellules transfectées. Des extraits protéiques de cerveau, principal lieu d'expression du récepteur, sont ajoutés ou non dans le milieu. Les signaux positifs obtenus par la liaison du GHS-R1a avec certains GHS comme l'hexareline leur ont permis de calibrer leur système. Sans grand succès, ils décident de rechercher le ligand endogène

inconnu du récepteur de la motiline (GPR38), très homologue au GHS-R1a, en espérant ensuite identifier par homologie de séquence le ligand endogène du GHS-R1a (Kojima 2008). Le GPR38 étant très exprimé dans l'estomac, leurs premiers essais portent sur des extraits protéiques d'estomac. A leur grande surprise, ces mêmes extraits induisent une très forte augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules transfectées par le récepteur GHS-R1a. Persuadés d'un artefact, ils se rendent compte par la suite que seulement quelques mg d'extrait de peptide suffisent à engendrer un fort signal positif. La ghréline fut ainsi identifiée par cette même équipe en 1999 (Kojima et al. 1999).

1.2.3 Synthèse et structure de la ghréline

La ghréline est majoritairement sécrétée par les cellules X/A-like de la muqueuse de l'estomac. Elle peut également être exprimée dans d'autres organes périphériques tels que l'intestin, le pancréas, les reins, les poumons, les glandes surrénales, le foie, la vésicule biliaire, les muscles, la rate et la thyroïde (Gnanapavan et al. 2002). Le gène humain de la ghréline est localisé sur le chromosome 3p25-26. Il encode un précurseur de 177 acides aminés, la prépro-ghréline (Kojima et al. 1999). La prépro-ghréline est clivée en deux peptides : la ghréline et l'obestatine (**Figure 4**). La séquence de la ghréline a été identifiée par l'équipe du Dr Kenji Kangawa grâce à la méthode Edman dégradation. Le peptide se compose de 28 acides aminés (**Figure 1**) (Kojima et al. 1999). Le troisième acide aminé a été difficilement caractérisé du fait de sa modification (Kojima 2008). En effet, la sérine 3 possède un groupement acyl (acide octanoïque) qui confère à la ghréline toute son activité. Cette η -octanoylation est une modification post traductionnelle effectuée par l'O-acétyltransférase de la ghréline (GOAT) découverte en 2008 parmi les membres de la famille des O-acétyltransférases liées à la membrane (MBOATs) (Yang et al. 2008). La ghréline est le premier peptide naturel sur lequel on a rapporté une modification post-transcriptionnelle d'acylation.

La forme désacylée de l'hormone (désacyl-ghréline) est également sécrétée. Elle représente 90 % de la ghréline totale circulante dans le sang (Patterson et al. 2005). Bien qu'elle ne soit pas capable de lier GHS-R1a, il semblerait qu'elle provoque des effets physiologiques via un autre récepteur inconnu (Granata et al. 2007, Chung et al. 2008). Certains de ces effets seraient inverses à ceux de la ghréline acylée. (Broglio et al. 2004, Gauna et al. 2005).

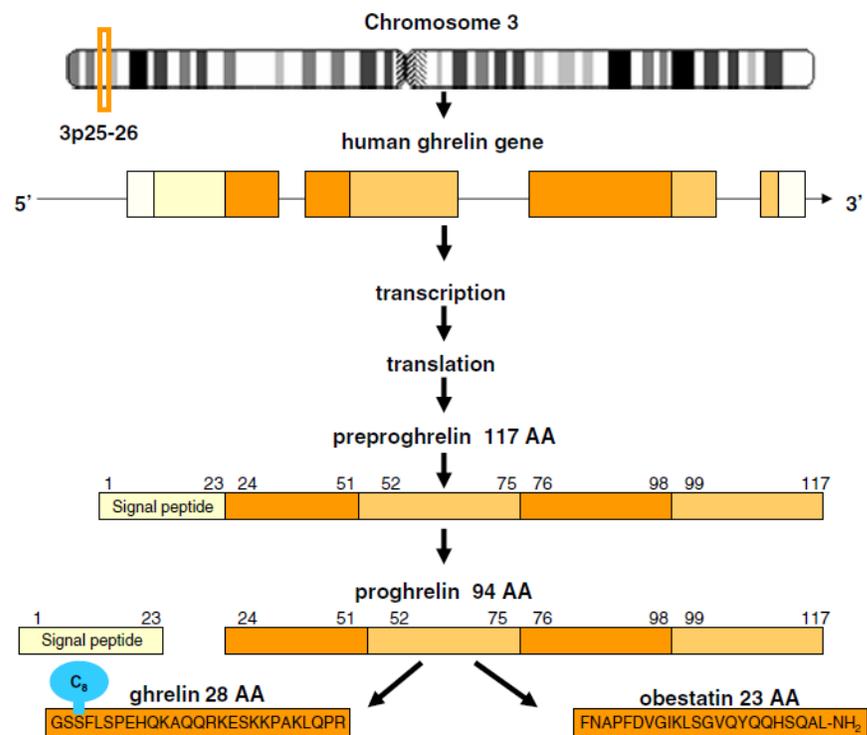


Figure 4. Synthèse de la ghréline

Modifié à partir de (Lim et al. 2011).

1.2.4 Activités biologiques de la ghréline

Outre son action sur la sécrétion de GH, la ghréline est impliquée dans d'autres processus dont la régulation de l'homéostasie énergétique (**Figure 5**). La ghréline est sécrétée lors du jeûne. Son action à court terme est de stimuler la prise alimentaire en induisant un signal au niveau de l'hypothalamus. A long terme, elle agit au niveau des tissus périphériques pour maintenir l'équilibre énergétique.

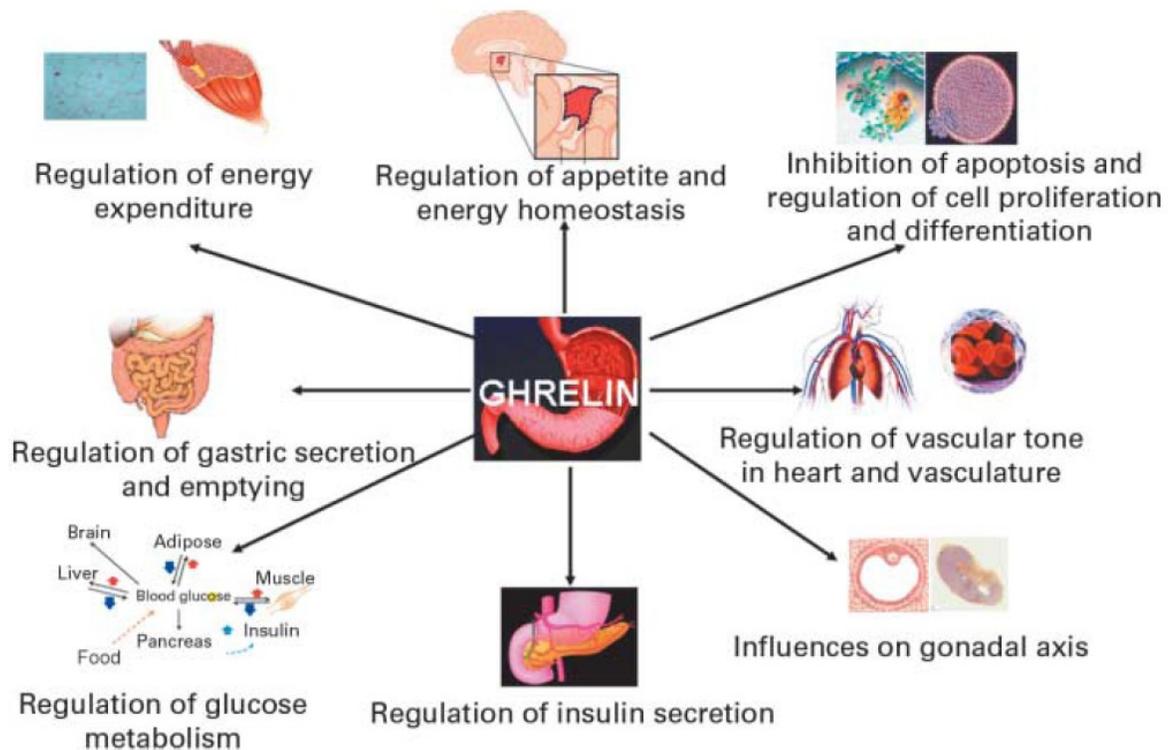


Figure 5. Fonctions biologiques principales de la ghréline

Extrait de (Gil-Campos et al. 2006).

1.2.4.1 Effets neuroendocrines

Le premier effet démontré de la ghréline a été sa capacité à stimuler la sécrétion de GH dans l'hypophyse. Cette action, dose-dépendante, s'effectue via le GHS-R1a et de façon synergique avec celle du neurohormone *GH-releasing hormone* (GHRH, somatolibérine) sécrété par l'hypothalamus (Takaya et al. 2000, Hataya et al. 2001). Cela indique qu'il s'agit de deux signalisations indépendantes. Toutefois, il semblerait que la ghréline nécessite l'intégrité de la fonction du système *GH-releasing hormone* pour agir (Tannenbaum et al. 2003). La ghréline stimule également faiblement la sécrétion de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), du cortisol et de la prolactine (Arvat et al. 2001). De plus, l'injection de ghréline inhibe la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH), une hormone gonadotrope sécrétée par l'hypophyse (Furuta et al. 2001).

1.2.4.2 Effets orexigéniques

L'effet le plus connu de la ghréline est sans doute sa capacité à stimuler la prise alimentaire via son action sur les noyaux arqués de l'hypothalamus. Chez l'homme, la concentration de la ghréline dans le sang augmente pendant le jeûne puis diminue après un repas ou une ingestion de glucose (Tschop et al. 2000) (Cummings et al. 2001). L'expression de la ghréline semble également inversement corrélée avec l'insulinémie (Purnell et al. 2003), bien que ceci ait été contredit par l'équipe du Dr Luger qui suggère que la ghréline n'est régulée ni par l'insuline ni par le glucose (Schaller et al. 2003).

Les premières expériences révélant l'action orexigénique de la ghréline ont été effectuées par l'équipe du Dr Heiman qui démontre qu'une administration intra-cerebro-ventriculaire chez le rat augmente la prise alimentaire et la prise de poids à court terme (Tschop et al. 2000). Des études électro-physiologiques confirment ces résultats en démontrant l'effet de la ghréline sur l'activation des neurones des noyaux arqués (NPY) (Traebert et al. 2002, Riediger et al. 2003). L'effet orexigénique de la ghréline est dépendant de son récepteur GHS-R1a mais aussi du récepteur CB1 (Kola et al. 2008, Alen et al. 2013, Lim et al. 2013). Lors de l'utilisation de ghréline exogène, il est possible de ne

pas induire cet effet en utilisant une faible dose injectée (200 µg/injection) (Barazzoni et al. 2007).

1.2.4.3 Effets sur le métabolisme énergétique

Lors du jeûne prolongé, la ghréline a pour rôle de maintenir l'homéostasie énergétique. De ce fait, elle va entre autres augmenter le stock lipidique dans le tissu adipeux, augmenter la production de glucose au niveau du foie et diminuer la production d'insuline par le pancréas. La ghréline réduit la lipolyse et induit la différenciation *in vitro* des pré-adipocytes (Choi et al. 2003). Chez le rat, une injection quotidienne de ghréline induit l'adipogénèse. Ceci s'accompagne de l'augmentation du quotient respiratoire traduisant une diminution de l'utilisation des lipides au profit des glucides (Tschop et al. 2000).

Au niveau du foie, l'insuline inhibe la gluconéogenèse via la voie de signalisation IRS/PI3-K/AKT qui mène notamment à la répression du gène de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Dans des cellules hépatiques, des évidences montrent que la ghréline module la signalisation de l'insuline en inhibant AKT ce qui favorise la gluconéogenèse (augmentation de l'expression de PEPCK) (Murata et al. 2002). *In vivo*, chez le rat, deux injections quotidiennes de ghréline pendant 4 jours engendrent une hyperglycémie. Chez ces animaux, la ghréline diminue la phosphorylation d'AKT hépatique, ce qui induit la gluconéogenèse (Barazzoni et al. 2007). Dans le même sens, il a été démontré qu'un traitement à la ghréline provoque, dans des hépatocytes primaires de porc à jeun, une augmentation de la production de glucose (Gauna et al. 2005). De plus, la ghréline provoque une déphosphorylation de la kinase activé par l'AMP (AMPK) dans le foie de rat, ce qui induit les gènes d'enzymes lipogéniques (acetyl-CoA carboxylase, ACC et synthétase des acides gras, FAS), glycogéniques (Glucose-6-Phosphatase, G6-Pase) et impliqués dans la phosphorylation oxydative (*uncoupling protein 2*, UCP2) (Barazzoni et

al. 2005). Cet effet de la ghréline sur l'AMPK dans le foie a été démontré dépendante de GHS-R1a (hépatique ou non) (Lim et al. 2013). En accord avec ces résultats, un effet négatif de la ghréline a également été observé sur la β -oxydation hépatique de rat (Rigault et al. 2007). D'après cette même étude, le rôle de la ghréline dans la régulation de l'oxydation des acides gras dans le foie ne serait pas direct (effets observés lorsque le traitement est réalisé dans l'animal, pas lorsque les cellules primaires sont traitées). Enfin, chez l'humain, un apport de ghréline exogène à long terme provoque également une hyperglycémie (Vestergaard et al. 2008).

La ghréline module également la sécrétion d'insuline par le pancréas. *In vitro*, un traitement ghréline sur des cellules de pancréas en culture inhibe la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Colombo et al. 2003). Il en est de même, dans les modèles animaux (Reimer et al. 2003). De plus, chez l'humain, un apport de ghréline exogène provoque une hypoinsulinémie qui revient à la normale lorsque que l'administration est stoppée (Vestergaard et al. 2008). L'hypoinsulinémie peut être expliquée par une action répressive de la ghréline sur la libération d'insuline dans le pancréas (Dezaki et al. 2004).

L'administration de ghréline a également été réalisée chez des patients déficients en GH ou en présence de somatostatine (neuro-hormone antagoniste qui inhibe la libération de GH) (Gauna et al. 2005, Vestergaard et al. 2008). Dans tous les cas, les effets diabétogéniques du traitement ghréline sont constatés (hyperglycémie, augmentation du taux d'acide gras libre et diminution de l'insulinémie). Ceci démontre que l'action de la ghréline sur ces tissus périphériques est indépendante de la présence de GH.

1.2.5 Modèles animaux

Le phénotype métabolique basal des souris dont les gènes *Ghs-r1a* (*Ghs-r1a*^{-/-}) et *Ghréline* (*Ghr*^{-/-}) ont été invalidés est comparable au phénotype sauvage. Le mutant double (*Ghs-r1a*, *Ghr*^{-/-}) montre une faible réduction de la dépense énergétique (Pfluger et al. 2008). Un test de tolérance au glucose révèle une sécrétion de l'insuline et une clairance du glucose plus rapide chez la souris *Ghr*^{-/-} que chez la souris sauvage (Sun et al. 2003, Dezaki et al. 2004)

Une déficience de l'enzyme GOAT responsable de l'octanoylation de la ghréline révèle une augmentation des dépenses énergétiques, une diminution modérée d'accumulation de gras et une glycémie normale (Kirchner et al. 2009). En condition de restriction calorique, ces souris présentent une forte incapacité à maintenir leur glycémie (insulinémie normale). Un jeûne de 7 jours suffit à les rendre mourantes tandis qu'une injection de ghréline améliore leur état de santé (Zhao et al. 2010).

1.3 La régulation génique

1.3.1 Les récepteurs nucléaires

La superfamille des récepteurs nucléaires regroupe des facteurs de transcription de structure semblable qui sont activés directement par des ligands dans le but de réguler l'expression de gènes cibles. Cette régulation est centrale dans bon nombre de grands processus cellulaires tels que le développement et le métabolisme. Les récepteurs nucléaires sont classés en trois familles selon la nature de leur ligand (Moore et al. 2002).

La première famille est composée des récepteurs stéroïdiens qui fonctionnent en homodimères (ligands hormonaux). Il s'agit par exemple du récepteur des estrogènes (ER) et du récepteur des glucocorticoïdes (GR). Le second groupe comprend les récepteurs reconnus par des ligands dérivés des acides gras alimentaires. Ils fonctionnent en hétérodimères avec le *retinoic X receptor* (RXR). Parmi ceux-ci : les *peroxisome proliferator-activated factor* (PPAR), le *liver X receptor* (LXR) et le *farnesoid X receptor* (FXR) sont comptés. Enfin le troisième groupe correspond aux récepteurs nucléaires orphelins (sans ligand connu) tels que le *human nuclear factor 4* (HNF4) et le *estrogen-related receptor α* (ERR α).

La structure des récepteurs nucléaires, commune à toutes les familles, est composée de six domaines distincts, désignés de A à F (depuis l'extrémité N-terminale jusqu'à l'extrémité C-terminale) (Laudet et al. 1992). Le domaine A/B est responsable de la fonction d'activation ligand-indépendante (AF-1). Le domaine de liaison à l'ADN (DBD, domaine C) est hautement conservé et contient deux motifs en doigts de zinc (Khorasanizadeh et al. 2001). La partie D forme une région charnière qui maintient l'intégrité de la structure (Ylikomi et al. 1992). Le domaine E est responsable de la liaison au ligand (LBD) et de la fonction d'activation ligand-dépendante (AF-2). Le domaine F, dont la fonction reste inconnue, n'est pas présent chez tous les récepteurs nucléaires.

La fonction des récepteurs nucléaires est en lien direct avec leur structure. D'une part, via leur DBD, ils reconnaissent des séquences spécifiques des promoteurs des gènes cibles, typiquement formées de deux motifs hexa-nucléotidiques séparés par quelques nucléotides. D'autre part, via leur domaine LBD, les récepteurs nucléaires peuvent former des dimères avec d'autres récepteurs nucléaires et lier leur ligand (Nagy et al. 2004). Lorsque le ligand active le récepteur, il se produit un changement de conformation qui rend possible le recrutement de cofacteurs. C'est la liaison avec ces cofacteurs qui va permettre la transcription ou non des gènes cibles.

1.3.2 Les cofacteurs

L'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires est possible grâce au recrutement des cofacteurs (coactivateurs ou corépresseurs) (**Figure 6**). En règle générale, le récepteur nucléaire est lié à des corépresseurs jusqu'à ce que la présence de son ligand lui permette d'interagir avec les coactivateurs. Des exceptions existent néanmoins pour certains corépresseurs dont leur liaison avec le récepteur nucléaire est ligand-dépendante. Les activités enzymatiques de ces cofacteurs sont nombreuses. Les complexes activateurs sont essentiellement des remodeleurs de la chromatine et des acétyltransférases des histones (HAT) qui permettent la décondensation de la chromatine puis la liaison des facteurs généraux de la transcription (initiation de la transcription). Les complexes corépresseurs quant à eux, sont essentiellement des histones desacétylases tels que le répresseur du récepteur nucléaire (NCoR) et le médiateur silencieux des rétinoïdes et de l'hormone thyroïdienne (SMRT) (Perissi et al. 2005). La plupart des cofacteurs ne présentent pas de spécificité tissulaire d'expression, à l'exception notable du *peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 α* (PGC-1 α).

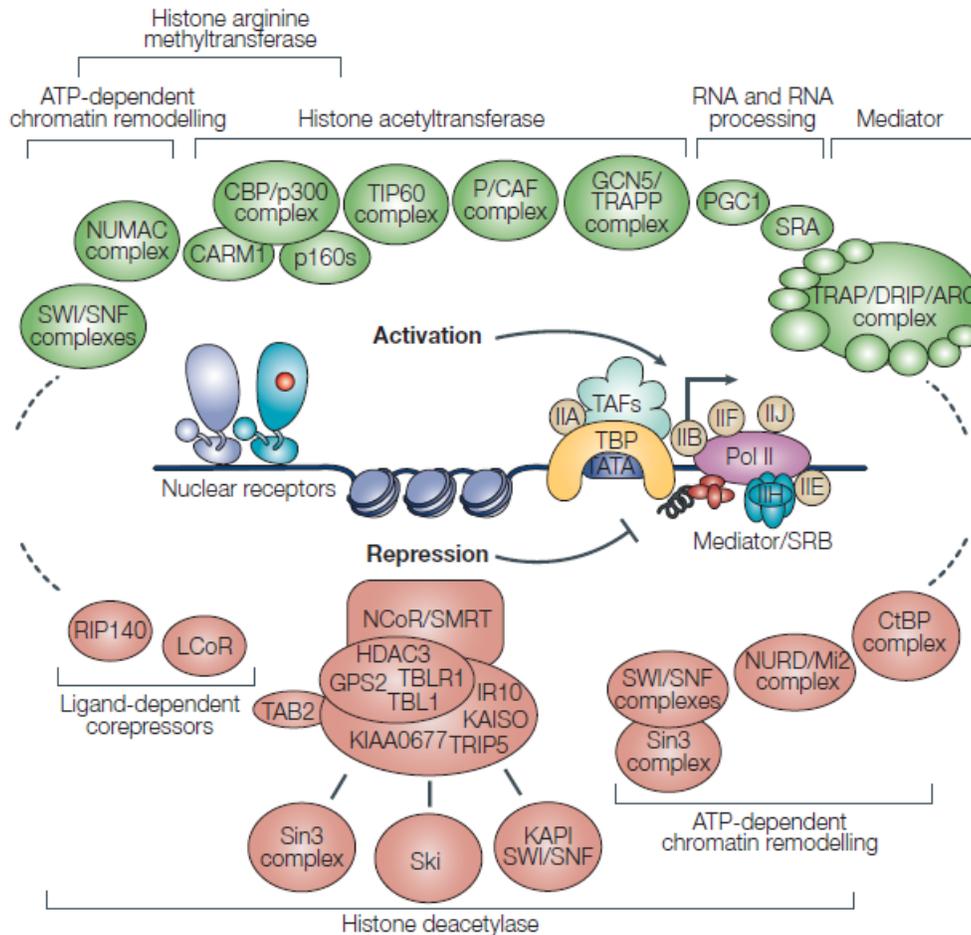


Figure 6. Complexes coactivateurs et corépresseurs nécessaires à la régulation transcriptionnelle via les récepteurs nucléaires

Les complexes de coactivateurs sont représentés en vert et les complexes de corépresseurs en rouge. Extrait de (Perissi et al. 2005).

1.4 Le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α

Pendant longtemps, les facteurs de transcription liés à l'ADN ont représenté l'essentiel des études effectuées sur la régulation de la transcription. Depuis quelques années, de nouvelles évidences portent à croire que la modulation de l'expression génique est également due à la régulation tissus-spécifique ou condition-spécifique des cofacteurs impliqués. L'un des premiers exemples a sans doute été le *Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α* (PGC-1 α) découvert en 1998. A cette époque, les processus de différenciation des adipocytes bruns spécialisés dans la thermogénèse adaptative en réponse au froid, commençaient à être mieux compris. L'implication du récepteur nucléaire PPAR γ a été démontré et son activation s'est révélée tissus-spécifique (Sears et al. 1996). Dans le but d'étudier les coactivateurs de ce récepteur nucléaire, l'équipe du Dr Spiegelman a entrepris une recherche de partenaire de PPAR γ par une approche de système double hybride en levure (criblage de banque d'ADNc d'adipocyte brun). Ils découvrent alors qu'un partenaire, nommée PGC-1 α , lie et active PPAR γ lorsqu'il est induit en condition de froid. Ce coactivateur transcriptionnel s'avère essentiel dans la régulation du processus de thermogénèse via la biogénèse mitochondriale (Puigserver et al. 1998). Depuis, de nombreuses autres fonctions telle que son implication dans la régulation du métabolisme gluco-lipidique hépatique lors du jeûne lui ont été associées.

Deux homologues de PGC-1 α ont par la suite été découverts et composent maintenant la famille des PGC-1 : PGC-1 β et *PGC-1-related coactivator* (PRC). Ces trois protéines possèdent des parties N-terminale et C-terminale conservées. D'après leur profil d'expression et les régulations qui en découlent, certaines de leurs fonctions biologiques semblent être communes à celles de PGC-1 α tandis que d'autres concernent différents processus cellulaires (Lin et al. 2002).

1.4.1 Structure de PGC-1 α

Le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α est une protéine de 798 acides aminés dépourvue d'activité enzymatique et dotée d'une structure permettant de nombreuses interactions protéine-protéine (**Figure 7**). La partie N-terminale de ce cofacteur possède un domaine activateur qui interagit avec les complexes d'histone acétylase dont le *steroid receptor coactivator 1* (SRC-1) et *cAMP response element binding protein (CREB) binding protein/p300* (CBP/p300) (Puigserver et al. 1999). La liaison entre PGC-1 α et ses partenaires facteurs de transcription s'effectue grâce aux motifs riches en leucine (L1, L2 et L3). S'en suit une région inhibitrice cible de modifications post traductionnelles. La partie C-terminale lie les complexes *thyroid receptor-associated protein (TRAP)/vitamin D receptor-interacting protein (DRIP)/Mediator* facilitant ainsi l'interaction avec la machinerie de transcription (Wallberg et al. 2003). Cette même partie détient un motif de reconnaissance et de liaison à l'ARN (RRM) et un domaine riche en résidus arginine et sérine (RS), caractéristique des protéines régulatrices de l'épissage.

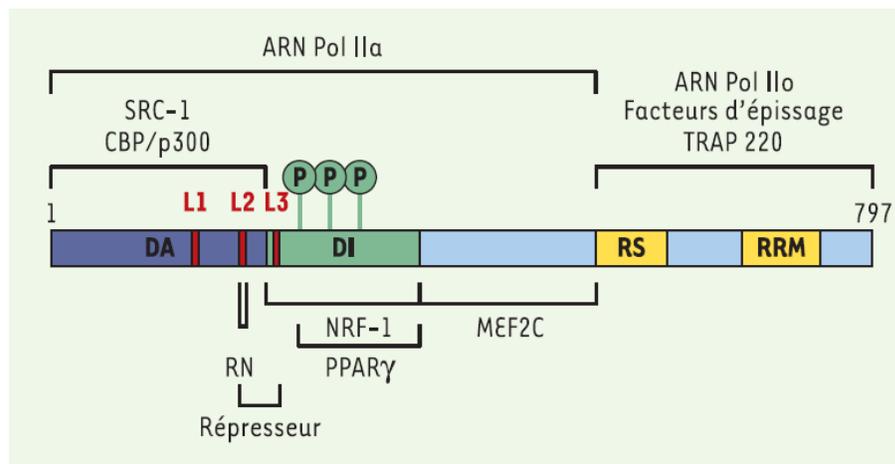


Figure 7. Structure du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α

Extrait de (Tiraby et al. 2005).

1.4.2 Régulation de PGC-1 α

L'homéostasie énergétique est un processus qui permet l'équilibre entre l'apport, le stockage et les dépenses énergétiques. Pour que l'organisme puisse s'adapter, il est nécessaire que cet équilibre soit robuste et flexible. Le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α , qui joue un rôle central dans cette adaptation, doit être finement régulé aussi bien au niveau de son expression, de sa localisation spatiale, de sa stabilité que de son activité. La modulation de la quantité protéique de PGC-1 α intervient dans une réponse à long terme tandis que les modifications post-traductionnelles sont impliquées en premier lieu en réponse rapide aux stimuli aigus. Deux importantes caractéristiques de PGC-1 α sont d'une part son induction suite à différents stimuli spécifiques et d'autre part ses effets tissu-spécifiques.

1.4.2.1 Régulation transcriptionnelle

La transcription de PGC-1 α est stimulée par différents facteurs selon le tissu concerné. D'une façon générale, PGC-1 α est surexprimé dans les situations de manque d'énergie (exercice, exposition au froid et jeûne) (**Annexe 1**). Au sein du muscle, l'expression de PGC-1 α est induite suite à un exercice (Goto et al. 2000, Baar et al. 2002, Norrbom et al. 2004). Au point de vue moléculaire cela se traduit par une augmentation du calcium intracellulaire due à la stimulation nerveuse. Il va alors se produire d'une part l'activation de *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV* (CaMKIV) qui phosphoryle le facteur de transcription CREB et d'autre part l'activation de *calcineurin A* (CnA) qui active à son tour les *myogenic transcription factors myocyte enhancer factor 2C* (MEF2C) et MEF2D (Handschin et al. 2003). L'exercice engendre également l'activation de *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38MAPK) qui, par la suite, active MEF2 et *activating transcription factor 2* (ATF2), deux facteurs de transcription qui induisent l'expression de PGC-1 α via les éléments de réponse MEF2 et CRE respectivement (Akimoto et al. 2005). Il a également été démontré que l'AMPK activée lors de l'exercice pourrait également

jouer un rôle dans l'augmentation de l'expression de PGC-1 α à long terme mais le mécanisme moléculaire reste inconnu (Suwa et al. 2003). L'insuline semble être impliqué dans la répression de PGC-1 α dans le muscle en activant AKT qui phosphoryle et désactive le facteur de transcription *forkhead box class-O* (foxO1) (Southgate et al. 2005).

Au sein du tissu adipeux brun et du muscle, une exposition aux basses températures induit l'expression de PGC-1 α (Puigserver et al. 1998, Wu et al. 1999). Cette condition environnementale est détectée par le système nerveux sympathique via les récepteurs adrénergiques (AR). Il a été démontré que l'expression de PGC-1 α était modulée via le β 3-AR dans les deux tissus (Boss et al. 1999, Gomez-Ambrosi et al. 2001). L'activation de ce type de récepteur engendre une signalisation via le messenger secondaire adénosine monophosphate cyclique (AMPC) qui active la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle le facteur de transcription CREB. Dans les adipocytes bruns, il a été démontré que p38MAPK était également impliqué dans la signalisation de l'AMPC (Cao et al. 2004).

Dans le foie, c'est le jeûne qui induit l'expression de PGC-1 α (Yoon et al. 2001). Ceci se traduit par une stimulation au glucagon (hormone pancréatique sécrété en situation de manque d'énergie) qui augmente l'AMPC et donc active PKA (Herzig et al. 2001). A l'inverse, l'insuline réduit l'expression de PGC-1 α via AKT (Southgate et al. 2005). Les acides gras libres sont capables d'induire l'expression de PGC-1 α via l'activation de p38MAPK (Collins et al. 2006). L'induction de l'expression de PGC-1 α en réponse au jeûne est réduite lorsque l'AMPK est activée, la translocation du coactivateur transcriptionnel de CREB (TORC2) dans le noyau étant bloquée (Shaw et al. 2005).

1.4.2.2 Modifications post-traductionnelles

Tout au long de sa séquence, PGC-1 α possède des sites ciblés par de nombreuses modifications post-traductionnelles (**Figure 8**) qui modulent son activité, sa stabilité ou sa localisation cellulaire. Jusqu'à maintenant il a été démontré que PGC-1 α pouvait subir des modifications de types acétylation, phosphorylation, ubiquitination, méthylation et glycolysation impliquant une β -N-acetylglucosamine (GlcNAcylation) (Fernandez-Marcos et al. 2011). Seules les trois premières seront exposées.

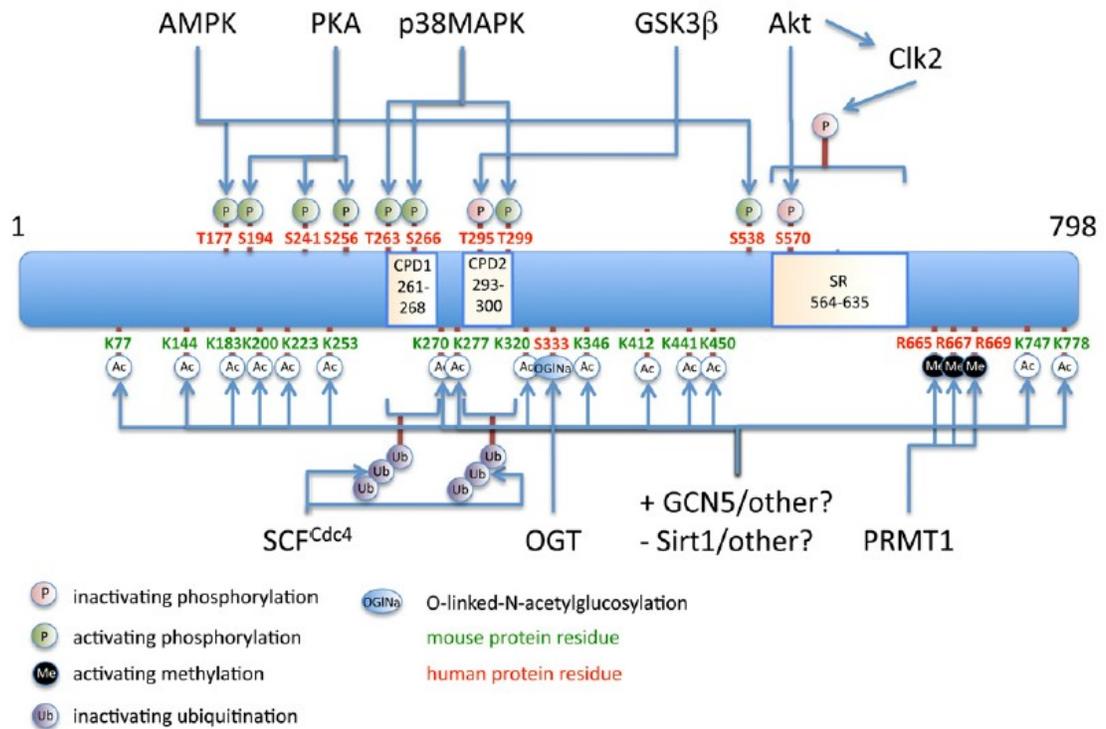


Figure 8. Régulation post traductionnelle de PGC-1 α

Extrait de (Fernandez-Marcos et al. 2011).

1.4.2.2.1 Acétylation

L'acétylation est une modification caractérisée par l'ajout d'un groupement acétyl sur un résidu lysine. La réaction inverse est appelée la désacétylation. Les enzymes responsables de ces réactions sont les acétyltransferases et les désacétylases, respectivement. Les voies métaboliques (cataboliques ou anaboliques) de la majorité des macronutriments conduisent à la formation d'acétyl-coA et du coenzyme nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺). Le premier est le substrat des acétyltransferases et le second des désacétylases NAD-dépendantes. C'est pour cela que l'acétylation est courante dans la régulation des protéines impliquées dans l'homéostasie énergétique. Treize résidus lysine ont été identifiés dans la séquence de PGC-1 α (Rodgers et al. 2005). L'état d'acétylation de PGC-1 α est directement lié au statut énergétique de la cellule puisqu'il est augmenté en conditions d'excès énergétique (activité réduite) et diminué en condition de restriction calorique (activité augmentée).

Plusieurs acétyltransferases sont capables de lier PGC-1 α mais une seule a été démontrée comme responsable de son acétylation : GCN5 (Lerin et al. 2006). Ceci se traduit par une diminution de l'activité transcriptionnelle de PGC-1 α en test d'activité de gène rapporteur mais aussi par une diminution de l'induction d'expression des gènes de la gluconéogenèse hépatique *in vitro* et *in vivo* (Lerin et al. 2006). Il a également été démontré qu'une surexpression de GCN5 induisait une relocalisation de PGC-1 α dans des foci nucléaires causant l'éloignement du coactivateur vis-à-vis de ces promoteurs cibles (Lerin et al. 2006).

L'acétylation de PGC-1 α est régulée par l'activité de GCN5 (**Figure 9**). Des évidences démontrent que l'expression de GCN5 est augmentée par la présence du *steroid receptor coactivator protein* (SRC-3) lui-même induit chez l'animal en condition de régime alimentaire riche (Coste et al. 2008). Une étude récente démontre que l'acétylation de

PGC-1 α peut également être régulée par un signal hormonal. C'est le cas du glucagon qui induit l'expression et la phosphorylation de *Cbp/p300-interacting transactivator 2* (CITED2) via l'activation de la PKA. CITED2 inhibe l'acétylation de PGC-1 α en liant GCN5. L'insuline va produire l'effet inverse puisqu'elle inhibe l'interaction CITED-GCN5 de façon PI3-K/AKT dépendante (Sakai et al. 2012). L'acétylation de PGC-1 α est également modulée selon la disponibilité du substrat de GCN5 (**Figure 9**). Le pool d'acétyl-coA est en partie dépendant du citrate (dérivé du glucose) produit par l'enzyme adénosine triphosphate (ATP) citrate lyase (ACL) (Wellen et al. 2009). Il a été observé que la réduction d'expression d'ACL bloque l'acétylation des histones dans le noyau tout comme la réduction d'expression de GCN5 (Wellen et al. 2009). Il est alors possible d'envisager que l'enzyme ACL joue un rôle dans l'action de GCN5 au niveau des coactivateurs également.

La seule désacétylase connue comme responsable de la désacétylation *in vivo* et *in vitro* de PGC-1 α par liaison directe est la protéine Sirtuin (Sirt1) (Nemoto et al. 2005, Rodgers et al. 2005). Il a été rapporté qu'une surexpression de Sirt1 induit l'expression des gènes de la gluconéogenèses cibles de PGC-1 α dans le foie (Rodgers et al. 2007). De la même façon, dans le muscle, une modulation de l'expression de Sirt1 module l'expression des gènes cibles de PGC-1 α (Lagouge et al. 2006). Il semble également que la désacétylation de PGC-1 α est dépendante de sa phosphorylation par AMPK (Canto et al. 2009). L'effet activateur de Sirt1 sur PGC-1 α n'est pas encore bien établi. Il semblerait que, selon les gènes cibles observés, Sirt1 peut voir un effet répresseur comme c'est le cas pour les gènes de la glycolyse dans le foie (Rodgers et al. 2005). De plus, des essais d'activité en gène rapporteur révèlent un effet inhibiteur de Sirt1 justifié par un recrutement possible de corépresseurs (Nemoto et al. 2005).

Trois mécanismes semblent réguler la désacétylation de PGC-1 α par Sirt1 ; le niveau protéique de Sirt1, l'activité de Sirt1 selon la quantité de NAD⁺ et l'activité de Sirt1

selon ses modifications post traductionnelles ou la liaison avec d'autres facteurs (**Figure 9**). L'expression de Sirt1 est induite en cas de restriction calorique (implication du facteur de transcription FoxO3a ou du corépresseur CtBP) et réprimée en cas de surplus nutritionnel (via le facteur de transcription ChREBP) (Nemoto et al. 2005, Zhang et al. 2007, Noriega et al. 2011). Grâce à la surexpression de l'enzyme nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), responsable de la transformation du nicotinamide en nicotinamide mononucleotide (qui forme ensuite le NAD^+), il est possible de moduler l'activité de Sirt1. Ceci démontre la régulation de cette désacétylase via la quantité de son substrat (Revollo et al. 2004). L'augmentation des niveaux de NAD^+ dans les conditions de manque énergétique comme le jeûne et l'exercice a été observé dans de nombreux tissus. A contrario, dans les situations de surplus énergétique comme lors d'un apport nutritionnel riche, les niveaux de NAD^+ diminuent (Revollo et al. 2013). Ceci impliquerait le ratio AMP/ATP qui active l'AMPK et engendre l'augmentation des niveaux de NAD^+ de façon NAMPT-dépendante (Fulco et al. 2008) ou NAMPT-indépendante (Canto et al. 2009). L'activité de Sirt1 est également modulée par sa phosphorylation, sa SUMOylation et sa méthylation (Revollo et al. 2013). La liaison de Sirt1 avec des protéines régulatrices telles que AROS ou DBC1 semble activer et inhiber respectivement Sirt1 (Revollo et al. 2013).

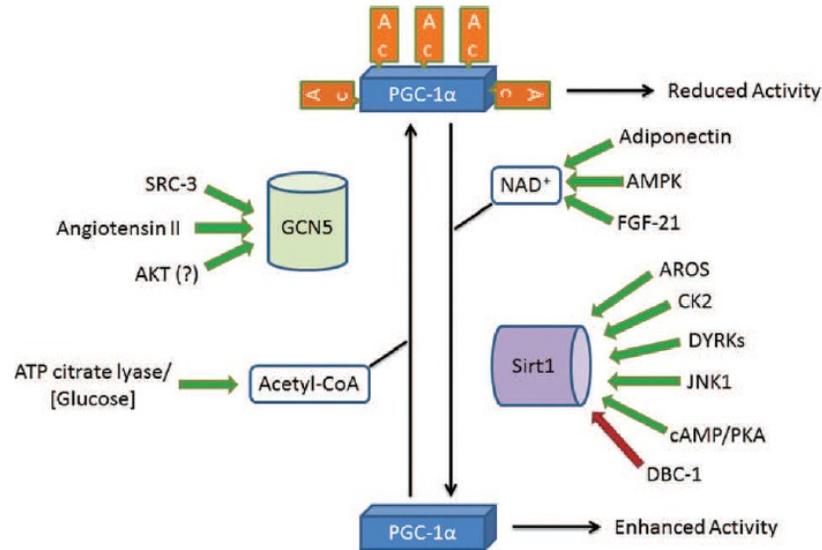


Figure 9. Régulation de l'acétylation/désacétylation de PGC-1 α

Les flèches vertes représentent les activations tandis que les rouges représentent les inhibitions. Extrait de (Dominy et al. 2010).

1.4.2.2.2 Phosphorylation

D'une façon générale, la phosphorylation est l'ajout d'un groupement phosphate sur un résidu sérine, thréonine ou tyrosine. Cette modification est catalysée par une kinase tandis que la déphosphorylation est l'action d'une phosphatase. La séquence de PGC-1 α comporte dix sites de phosphorylation ciblés soit par l'AMPK, AKT, p38MAPK, S6 Kinase 1 (S6K1), *Glycogen synthase kinase 3* (GSK3 β) ou par PKA (**Figure 8**). Seules les kinases dont l'action a été la mieux caractérisée seront présentées ici.

L'AMPK joue un rôle de senseur dans la régulation du métabolisme énergétique. Activée par une augmentation du ratio AMP/ATP, cette kinase déclenche les réactions cataboliques cellulaires et inhibe les réactions anaboliques dans le but de rééquilibrer la balance énergétique. La liaison et l'activation directe de PGC-1 α par l'AMPK a été décrite dans le muscle en réponse à un traitement 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR), activateur de l'AMPK. S'en suit une induction des gènes de la biogénèse

mitochondriale (Jager et al. 2007). Le rôle de l'AMPK dans la régulation de PGC-1 α au sein du foie est moins clair. L'activation de PGC-1 α induit les gènes impliqués dans la gluconéogenèse tandis que l'AMPK activé par AICAR ou par la metformine engendre la réduction des gènes de la gluconéogenèse.

Suite à un apport nutritionnel, le pancréas sécrète l'insuline qui a une action hypoglycémisante en réduisant notamment la gluconéogenèse et la glycogénolyse dans le foie. La kinase AKT est un effecteur de la voie de signalisation de cette hormone. Dans cette situation de balance énergétique positive, AKT, alors activée, inhibe l'activité transcriptionnelle de PGC-1 α en le phosphorylant (Li et al. 2007). Ceci bloque l'effet inducteur de PGC-1 α sur l'expression de gènes impliqués dans la gluconéogenèse ou la β -oxydation.

L'exposition au froid dans les adipocytes bruns et l'état de cachexie dans le muscle induisent tous deux l'activation de la kinase p38MAPK. La cachexie est une conséquence d'un état de dénutrition sévère qui implique des cytokines inflammatoires. Dans le cas d'une stimulation aux cytokines dans le muscle, il a été démontré que p38MAPK active PGC-1 α en phosphorylant trois sites présents dans le domaine répresseur (Puigserver et al. 2001). La phosphorylation de PGC-1 α par p38MAPK engendre d'une part l'augmentation de la stabilité (Puigserver et al. 2001) et d'autre part l'inhibition de la liaison PGC-1 α /corépresseurs (Fan et al. 2004). La kinase p38MAPK est également induite par l'exercice dans le muscle (Akimoto et al. 2005) et par les acides gras libres dans le foie (Collins et al. 2006). Cependant, aucune donnée n'est disponible sur la phosphorylation de PGC-1 α par p38MAPK dans ces conditions.

Deux nouveaux sites de phosphorylation par S6K1 ont été découverts récemment sur la protéine de PGC-1 α (Lustig et al. 2011). Toutes deux dans le domaine riche en résidus arginine et sérine (RS), ces modifications altèrent l'activité transcriptionnelle de PGC-1 α de façon promoteur-spécifique. S6K1 est activée dans le foie, par l'insuline ou des

acides aminés, lorsque les apports nutritionnels sont suffisants (Um et al. 2006). La phosphorylation de PGC-1 α qui s'en suit altère sa capacité à induire les gènes de la gluconéogenèse mais pas de la biogénèse mitochondriale ou de la β -oxydation. Les groupements phosphate ajoutés semblent perturber l'interaction entre PGC-1 α et HNF4 (qui implique un motif LxxLL de PGC-1 α mais également son domaine RS) sans moduler son interaction avec d'autres partenaires tels que FoxO1, ERR α et PPAR α impliqués dans la régulation des gènes de la biogénèse mitochondriale ou de la β -oxydation (Lustig et al. 2011).

1.4.2.2.3 Ubiquitination

L'ubiquitination est caractérisée par l'ajout d'une ou plusieurs ubiquitines sur un résidu lysine suite à l'action de trois classes d'enzymes (E1, E2 et E3 ligases). La polyubiquitination est généralement le signal d'une dégradation dépendante du protéasome (chaîne formée via la lysine 48 de l'ubiquitine) ou un signal de modification protéique telles que la relocalisation cellulaire et le changement de conformation tridimensionnelle (chaîne formée via la lysine 63 de l'ubiquitine) (Passmore et al. 2004). Deux sites d'ubiquitination ciblés par *Skp1/Cullin/F-box-cell division control 4* (SCFCdc4) ont été identifiés dans la séquence de PGC-1 α (Olson et al. 2008). Cette liaison, phospho-dépendante (par GSK-3 β et p38MAPK), mène à la dégradation protéasomale de PGC-1 α . Ceci est en contradiction avec l'effet stabilisateur de p38MAPK sur PGC-1 α . Néanmoins ces deux régulations ne sont pas nécessairement actives dans les mêmes conditions ou les mêmes tissus.

La voie de dégradation ubiquitine-dépendante n'est pas la seule dégradation impliquée dans la régulation du niveau protéique de PGC-1 α . Une nouvelle étude a récemment mis en évidence une dégradation ubiquitine-indépendante de PGC-1 α (Adamovich et al. 2013). Il s'agit d'une dégradation par défaut régulée par la *flavoprotein NADH quinone oxidoreductase 1* (NQO1), une protéine située auprès de la sous unité

catalytique du protéasome et sensible au NADH. NQO1 lie et protège PGC-1 α de la dégradation par défaut (Adamovich et al. 2013). Responsable de la conversion du NADH en NAD, NQO1 participe également à l'activation de Sirt1. Les expériences effectuées sur des hépatocytes primaires révèlent que NQO1, induit durant le jeûne, est essentielle dans l'action de PGC-1 α sur gluconéogenèse et la β -oxydation (Adamovich et al. 2013).

Les modifications post-traductionnelles de PGC-1 α sont très nombreuses et leurs positions n'expliquent pas toujours le mécanisme de régulation impliqué. C'est le cas des acétylations qui couvrent l'ensemble de la protéine. Aucun élément ne permet, pour le moment, de déterminer si l'acétylation est responsable d'une autre action que la relocalisation de PGC-1 α dans les foci nucléaires. Il semblerait que l'affinité des interactions entre PGC-1 α et ses partenaires récepteurs nucléaires reste la même (Dominy et al. 2010). A contrario, certaines phosphorylations se sont révélées responsables de conséquences mécanistiques classiques telles que la perturbation d'une interaction (par exemple la phosphorylation via p38MAPK). Bien qu'il existe des effets contradictoires, les régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles de PGC-1 α semblent impliquer un ensemble de facteurs redondants.

1.4.3 Fonctions de PGC-1 α dans la régulation de l'expression génique

Le coactivateur PGC-1 α est un intermédiaire entre certains facteurs de transcription et la machinerie de transcription qui lui confère la capacité d'induire l'expression de gène cible (**Figure 10**). Il détient également un rôle, moins exploré, dans l'épissage de l'ARN messenger. Ici seront présentés la majorité des gènes régulés par PGC-1 α et impliqués dans la thermogénèse adaptative, le métabolisme des acides gras, le métabolisme du glucose et la détoxification des espèces réactives de l'oxygène. Le phénotype des certains modèles de

souris transgéniques pour lesquelles le gène de PGC-1 α est invalidé (perte de fonction) sera présenté afin de conforter les résultats des études effectuées avec une approche de surexpression de PGC-1 α (gain de fonction). Parmi ces modèles animaux, deux lignées de souris avec le gène de PGC-1 α invalidé (*Pgc-1 α ^{-/-}*), ont été développées de façon indépendante par les équipes du Dr Spiegelman (Lin et al. 2004) et du Dr Kelly (Leone et al. 2005).

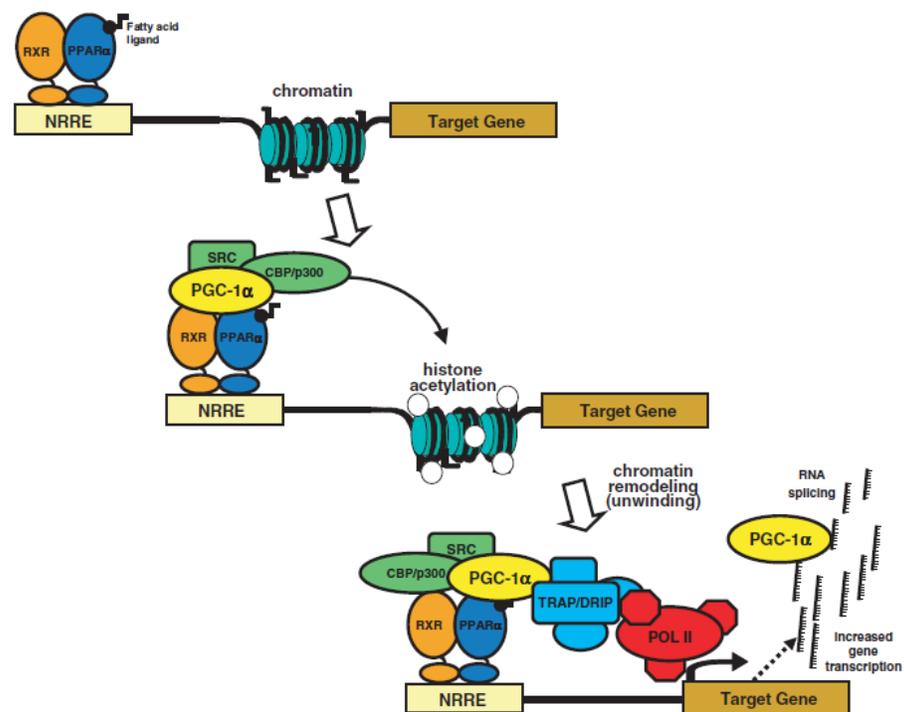


Figure 10. Mécanisme d'action de PGC-1 α sur le promoteur de ses gènes cibles

Extrait de (Finck et al. 2007).

1.4.3.1 La thermogénèse adaptative

La thermogénèse adaptative est un processus physiologique qui permet la production de chaleur en réponse à un stimulus environnemental tel qu'une exposition au froid. Chez le rat, le tissu adipeux brun est le principal organe responsable de la thermogénèse adaptative en réponse au froid. Cependant, chez les humains adultes dépourvus de dépôts majeurs d'adipocytes bruns, les muscles squelettiques peuvent également réaliser ce processus indépendant des frissons. Dans ces deux tissus, la thermogénèse adaptative implique la biogenèse des mitochondries, l'oxydation des acides gras et le découplage de la phosphorylation oxydative (OXPHOS). L'objectif est, lors d'une exposition au froid, d'utiliser les acides gras pour produire de l'énergie qui va être dissipée sous forme de chaleur (**Annexe 2**).

In vivo, une surexpression de PGC-1 α dans le muscle engendre une conversion des fibres blanches glycolytiques en fibres rouges oxydatives caractérisées par une importante biogénèse mitochondriale (Lin et al. 2002). Chez l'homme, il a été démontré qu'un entraînement physique engendre l'expression de PGC-1 α et de la troponine (protéine contractile des fibres oxydatives) accompagnées d'une augmentation de proportions de fibres rouges oxydatives (Russell et al. 2003). Une autre étude démontre, qu'une surexpression de PGC-1 α dans le muscle augmente l'expression des *nuclear respiratory factors 1 and 2* (NRF1 et 2) qui vont induire l'expression d'enzymes impliquées dans la phosphorylation oxydative telles que *ATP-synthase*, *cytochrome c*, et *cytochrome oxidase IV* (Wu et al. 1999). De plus, PGC-1 α coopère directement avec NRF1 pour induire l'expression de *mitochondrial transcription factor A* (mtTFA) impliqué dans la réplication de l'ADN mitochondrial (Wu et al. 1999). De la même façon, dans les adipocytes, un apport exogène de PGC-1 α induit l'expression de gènes mitochondriaux tels que *ATP synthase*, *cytochrome oxidase II* et *IV* tout en augmentant considérablement le nombre de mitochondries (Puigserver et al. 1998). Dans ces deux dernières études, un découplage de la phosphorylation oxydative est également causé par PGC-1 α via l'induction du gène de l'enzyme UCP2 dans les myotubes et UCP1 dans les pré-adipocytes. Ces enzymes sont

responsables du découplage entre la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP permettant la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur. Seuls les adipocytes bruns expriment UCP1, tandis qu'UCP2, dont la fonction est moins connue, est exprimée de façon ubiquitaire.

Les deux modèles de souris *Pgc-1 α* ^{-/-} possèdent une activité mitochondriale réduite avec des niveaux protéiques des enzymes de la chaîne respiratoire diminués. De plus, ces souris sont intolérantes au froid et possèdent une faible performance musculaire. (Lin et al. 2004, Leone et al. 2005). Il a été démontré, également, que les souris créées par l'équipe du Dr Spiegelman ne sont pas dépourvues en tissus adipeux bruns ce qui est étonnant au vu du rôle essentiel de PGC-1 α dans la différenciation des pré-adipocytes en adipocyte bruns. Ceci pourrait s'expliquer par une compensation via PGC-1 β . (Lin et al. 2004). De la même façon, un autre modèle de souris, où PGC-1 α n'est pas exprimé dans le tissu adipeux, possède des adipocytes bruns fonctionnels (Kleiner et al. 2012).

1.4.3.2 Le métabolisme des acides gras

Dans les situations de balance énergétique négative (exercice ou jeûne), le substrat privilégié pour la production d'ATP sont les acides gras. Des études démontrent que l'expression de PGC-1 α dans les pré-adipocytes, les adipocytes blancs et les myocytes cardiaques entraîne une augmentation de la transcription des gènes codants pour *medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase* (MCAD) et *carnitine palmitoyl transferase 1* (CPT-1) qui contrôle l'étape limitante de l'oxydation des acides gras (Lehman et al. 2000, Vega et al. 2000, Tiraby et al. 2003). Dans le muscle squelettique également, PGC-1 α augmente l'expression de *fatty-acid translocase*, CPT-1 et MCAD (Olesen et al. 2010). Les récepteurs nucléaires impliqués dans cette régulation sont PPAR α ou ERR α selon les types cellulaires (Vega et al. 2000, Schreiber et al. 2003). Dans le foie également, PGC-1 α coopère avec le récepteur nucléaire HNF4 pour augmenter l'expression de CPT-1 (Louet et al. 2002). L'implication de PGC-1 α dans le métabolisme des acides gras hépatique se

révèle dans le phénotype d'une des deux lignées de souris $PGC-1\alpha^{-/-}$ qui présente, suite à un jeûne, le développement de stéatoses hépatiques causées par l'accumulation de gras dans leur modèle (Leone et al. 2005).

1.4.3.3 Le métabolisme du glucose

Lors du jeûne, il est important de maintenir la glycémie stable. Dans le but de protéger les organes dépendants exclusivement du glucose, le foie augmente la gluconéogenèse. Dans les hépatocytes primaires, une surexpression de $PGC-1\alpha$ augmente l'expression des trois enzymes clés de la gluconéogenèse : PEPCK, fructose-1,6-bisphosphatase, et G6-Pase. Ceci mène à l'augmentation de production de glucose hépatique (Yoon et al. 2001). *In vivo*, la surexpression de $PGC-1\alpha$ chez les souris nourries normalement induit les gènes de PEPCK et G6-Pase. L'implication des récepteurs nucléaires HNF4 et GR a été démontré dans cette même étude (Yoon et al. 2001). Dans une des deux lignées $Pgc-1\alpha^{-/-}$, une défaillance est décrite au niveau de la modulation de la gluconéogenèse hépatique en réponse aux hormones (Lin et al. 2004). Chez ces animaux, il se produit un phénomène compensatoire qui induit une gluconéogenèse constitutivement active insensible aux apports alimentaires.

Une surexpression de $PGC-1\alpha$ dans des myotubes induit une augmentation de l'expression de GLUT4 (un transporteur du glucose) dans les cellules en culture, ce qui provoque une augmentation de l'absorption de glucose dans ces cellules (Michael et al. 2001). Cet effet est dû en partie à la liaison et la coactivation du régulateur transcriptionnel *myocyte enhancer factor-2* (MEF2).

1.4.3.4 Détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Il a été démontré dans le cerveau que $PGC-1\alpha$ est impliqué dans la régulation de gènes responsables de la détoxification des ROS, dont *superoxide dismutase* (SOD1), *manganese SOD* (SOD2) et *glutathione peroxidase 1* (St-Pierre et al. 2006). Ceci

représente un mécanisme de protection des neurones contre le stress oxydatif. De plus, les souris des deux lignées *Pgc-1 α ^{-/-}* présentent des anomalies structurales dans le système nerveux central (Lin et al. 2004, Leone et al. 2005).

D'une façon générale, les fonctions de PGC-1 α sont très variées et souvent tissu-spécifiques. Son rôle est essentiel dans les situations de manque d'énergie (exercice, jeûne, exposition au froid). De ce fait, le phénotype des souris *Pgc-1 α ^{-/-}* ne varie pas beaucoup du phénotype sauvage lorsque la balance énergétique est à l'équilibre. La divergence entre les deux lignées des phénotypes sur certains points peut être expliquée par une variation du fond génétique ou de la méthode utilisée pour les développer (Leone et al. 2005). De plus, d'après ces modèles animaux, il semble que les actions de PGC-1 β (non présentées ici) soient en partie redondantes avec celles de PGC-1 α . Les souris *Pgc-1 α , Pgc-1 β ^{-/-}* meurent de défaillances cardiaques peu de temps après leur naissance (Lai et al. 2008). Ces souris présentent également des adipocytes bruns dont la fonction est affectée et la densité mitochondriale fortement réduite (Lai et al. 2008).

La **figure 11** représente schématiquement les différents rôles tissu-spécifiques de PGC-1 α sur le métabolisme énergétique. La régulation de PGC-1 α , tant au niveau de son expression que de son activité, est ciblée dans les tissus concernés par le stimulus environnementale. Une autre voie permet de réguler l'activité de PGC-1 α : la régulation de ses partenaires récepteurs nucléaires.

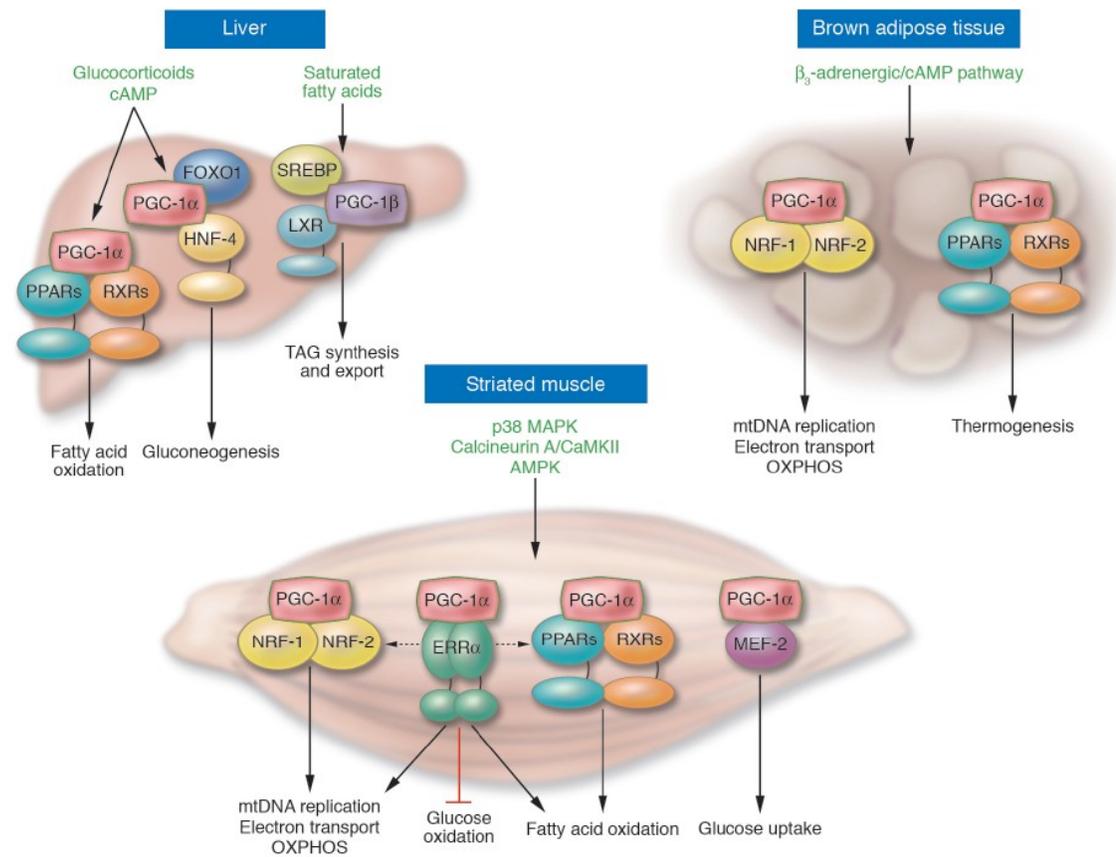


Figure 11. Différents rôles de PGC-1 α dans le muscle, le foie et le tissu adipeux brun

Extrait de (Finck et al. 2006).

1.4.4 Partenaires de PGC-1 α

Les partenaires de PGC-1 α sont très nombreux et peuvent être des cofacteurs comme des facteurs de transcription. Parmi ceux-ci, PGC-1 α coopère avec FXR, ERR α,β,γ , PPAR α,β,γ , ER α,β , LXR, GR, HNF4 α , NRF 1 et 2 et FoxO1 (Liang et al. 2006). Seule la coopération entre PGC-1 α et PPAR β sera présentée ici.

1.4.4.1 Peroxisome proliferator-activated receptor β (PPAR β)

Les récepteurs nucléaires de la famille des *peroxisome proliferator-activated receptor* sont des facteurs de transcription activés par un ligand endogène dérivé des acides gras ou par des composés synthétiques (thiazolidinediones). Les trois membres (PPAR α , β et γ), exprimés à partir de trois gènes différents, tiennent des rôles dans différentes voies métaboliques tels que le contrôle des gènes de l'oxydation des acides gras et de la lipogénèse dans différents tissus. Ils ont été à l'origine découverts comme cibles des proliférateurs du peroxyosome (Issemann et al. 1990). A l'inverse des deux autres membres, la fonction PPAR β est relativement peu étudiée. L'expression de PPAR β est ubiquitaire, mais un niveau élevé a été découvert dans les muscles et les macrophages (Vosper et al. 2001, Wang et al. 2003).

Il a été démontré dans les cultures de macrophages que l'activation de PPAR β par un agoniste synthétique favorise l'entrée et l'oxydation des acides gras réduisant ainsi l'accumulation de triglycérides (Bojic et al. 2012). D'autres rôles de PPAR β ont été caractérisés dans les macrophages *in vivo* et *in vitro* (Bojic et al. 2013), les adipocytes, les muscles et le cœur (Wagner et al. 2010). Parmi ceux-ci, l'augmentation de l'oxydation des acides gras et de la fonction mitochondriale dans les adipocytes et le muscle impliqueraient l'AMPK (Narkar et al. 2008). De nouvelles fonctions de PPAR β commencent à être découvertes notamment dans le foie. Une surexpression PPAR β hépatique, chez la souris, cause une accumulation de lipide et une augmentation de l'utilisation du glucose et de la lipogénèse *de novo* (Liu et al. 2011). D'autres études avaient montré au préalable, qu'une activation de PPAR β avec un agoniste synthétique diminue la production de glucose hépatique et favorise l'utilisation du glucose par le foie (Tanaka et al. 2003, Lee et al. 2006). L'activation de PPAR β est effectuée de façon endogène par les acides gras, triglycérides, prostacycline et acide rétinoïque et de façon pharmacologique grâce à de nombreux agonistes synthétiques tels que GW0742 et GW501516 (Wagner et al. 2010).

La structure de PPAR β est semblable à celle des autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (décrite dans la section 1.3.1). Ce récepteur nucléaire fonctionne en hétérodimère avec RXR α (Matsusue et al. 2006). Le ligand de PPAR β augmente son affinité avec RXR α et leur interaction est indépendante de leur liaison avec l'ADN (Matsusue et al. 2006). L'effet du ligand sur la capacité des PPARs à lier l'ADN est controversée (Wagner et al. 2010). Une étude qui porte sur la capacité de PPAR β à lier l'ADN démontre une liaison ligand-dépendante (Forman et al. 1997) tandis qu'une autre révèle une liaison ligand-indépendante (Wagner et al. 2009).

1.4.4.2 Interaction PGC-1 α /PPAR β

La majorité des études effectuées sur l'interaction entre le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α et le récepteur nucléaire PPAR β ont été réalisées dans le muscle (organe pour lequel les rôles de PPAR β sont les plus connus). Les similitudes entre les gènes cibles de PGC-1 α et les gènes cibles de PPAR β (dont UCP) ainsi que les mêmes actions sur la thermogénèse amènent à croire que ces deux protéines pourraient agir ensemble (Wang et al. 2003). Il s'avère effectivement que PGC-1 α lie (via son motif LxxLL) et coactive PPAR β de façon ligand-indépendante, même si le traitement au GW501516 augmente ces effets (Wang et al. 2003). La coactivation en essai de gène rapporteur a été confirmée par une autre étude qui révèle une coactivation ligand-dépendante cette fois (Dressel et al. 2003). L'activation de PPAR β par PGC-1 α engendre l'induction du gène CPT1 impliqué dans l'oxydation des acides gras (Dressel et al. 2003). Par la suite, une étude réalisée sur le muscle *in vivo* et *in vitro* révèle une spécificité, selon les promoteurs cibles, de l'action de PGC-1 α seul, PPAR β seul ou des deux ensembles. Par exemple, PGC-1 α est impliqué dans l'action de PPAR β sur les promoteurs de *Cpt-1b* et *Pdk4* mais pas de *Ucp3*. Néanmoins le promoteur de *pdk4* peut être activé sans PGC-1 α en présence du ligand de PPAR β . Selon les gènes cibles, la présence de PGC-1 α n'est pas toujours essentielle (Kleiner et al. 2009).

En ce qui concerne l'interaction PGC-1 α /PPAR β dans le foie, il est possible que PPAR β soit préférentiellement activé par PGC-1 β plutôt que par PGC-1 α qui va, lui, coactiver PPAR α (très présent dans le foie) (Liu et al. 2011). D'après cette étude, l'interaction PGC-1 β /PPAR β est impliquée dans la régulation de l'expression de l'*acetyl-CoA carboxylase 2* (ACC2).

1.5 Hypothèse et objectifs

Dans les conditions de restrictions caloriques, la ghréline cause une augmentation de la gluconéogenèse. Cette réponse physiologique fait intervenir des mécanismes de régulation de la transcription des gènes impliqués dans le contrôle du métabolisme gluco-lipidique. Deux des actions du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α sont d'augmenter l'expression des gènes de la gluconéogenèse et de la lipolyse au niveau du foie durant le jeûne.

Notre laboratoire étudie la biologie cellulaire des récepteurs nucléaires hormonaux. Nous avons mis en évidence, au cours de précédentes études, une activation de PPAR γ (partenaire de PGC-1 α) en réponse à la ghréline dans les macrophages (Demers et al. 2009). Cette régulation se traduit par une augmentation de l'efflux de cholestérol, important dans la réduction du développement de l'athérosclérose. Ces résultats démontrent un rôle de la ghréline au niveau périphérique dans les pathologies cardiovasculaires associées au syndrome métabolique.

Nous émettons l'hypothèse que la ghréline est impliquée dans la régulation du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α . Nos objectifs de recherche sont de déterminer la régulation de PGC-1 α en réponse à la ghréline, au niveau de l'activité transcriptionnelle, de certaines modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation et l'ubiquitination et de la capacité de PGC-1 α à lier et coactiver un de ses partenaires, PPAR β .

Les activités transcriptionnelles de PGC-1 α et de PPAR β seront réalisées grâce à des tests d'activité de gène rapporteur à la luciférase. Les expériences concernant les modifications post-traductionnelles de PGC-1 α et l'interaction PGC-1 α /PPAR β seront effectuées en Western blot. Les modèles cellulaires utilisés dans cette étude sont les cellules embryonnaires de rein humain HEK293 ainsi que les cellules d'hépatome humain HepG2.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire

Les cellules embryonnaires de rein humain HEK293 et les cellules d'hépatome humain HepG2 sont maintenues en culture dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma) avec phénol rouge et supplémenté avec 5 % ou 10 % de sérum bovin fœtal (FBS), respectivement. Les cellules sont incubées dans un milieu à 37 °C contenant 5 % de CO₂. Lorsque les cellules atteignent environ 70-80 % de confluence, elles sont transfectées transitoirement grâce à la méthode par phosphate de calcium pour les cellules HEK293 et par l'agent polycationique polyéthylèneimine (PEI) pour les cellules HepG2. Pour chaque expérience, les quantités d'ADN utilisées pour chaque puits sont compensées avec du plasmide CMX vide de façon à avoir la même quantité d'ADN total dans chaque condition.

2.2 Analyses par immunoprécipitation et Western blot

Test d'acétylation : Les cellules (pétris de 100 mm) sont transfectées avec 5 µg du vecteur d'expression pCMX-HA-mPGC-1α (94% d'homologie avec hPGC1α), 3 µg de pCMX-CBP et 2 µg de pCMX-CFP (utilisé comme contrôle de transfection) auxquels est ajouté 0,1 µg de pCDNA-hGHS-R1a. Les quantités de GHS-R1a varient de 0 à 0,1 µg pour l'expérience de la **figure 13B**. Le milieu de culture est changé pour un milieu frais le lendemain matin. Environ 36 h (heures) après la transfection, pour les conditions de contrôle positif d'acétylation, les cellules sont traitées 6 h avec 10 mM de nicotinamide (NAM) et 1 µM de trichostatine A (TSA) qui sont des inhibiteurs de désacétylases. Les traitements ghréline acylée (EZBiolab) sont effectués avec une dilution fraîche de 10⁻⁷ M pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite rincées puis récoltées dans 1 mL de PBS froid (*Phosphate-buffered saline*) supplémenté avec 10 mM de NAM et 1 µM de TSA. La lyse est effectuée dans un RIPA contenant 20 mM d'HEPES-KOH 0,8 M pH 7,9, 150 mM de

chlorure de sodium (NaCl), 0,5 % de Triton X-100, 2 mM d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), 10 mM de NAM, 1 μ M de TSA, 20 mM de fluorure de sodium (NaF), 1 mM d'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) et des inhibiteurs de protéase (Roche). Au moins trois expériences indépendantes ont été effectuées.

Test d'ubiquitination : Les cellules (plaque de 6 puits) sont transfectées avec 1 μ g du vecteur d'expression pCMX-MYC-mPGC-1 α , 1,5 μ g de pCMX-HA-Ubi et 0,035 μ g de pCDNA-hGHSR-1a selon les conditions. Le milieu de culture est changé pour un milieu frais le lendemain matin. Le soir même, les cellules sont traitées avec 1 μ M de MG132 dans du milieu frais pendant 16 h. Le lendemain les cellules sont traitées 30 minutes avec 10^{-7} M de ghréline acylée. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS froid puis récoltées dans 0,5 mL de PBS froid supplémenté avec 20 mM de N-éthylmaleimide (NEM) et 0,5 M de EDTA. La lyse est effectuée dans un RIPA contenant 50 mM de TRIS pH 7,5, 20 mM de NEM, 1 % de Triton X-100, 100 mM de NaCl, 0,8 % de dodécylsulfate de sodium (SDS), 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), 1 mM de NaF, 1 mM de Na_3VO_4 et des inhibiteurs de protéase. Trois expériences indépendantes ont été effectuées.

Co-immunoprécipitation : Les cellules (plaque de 6 puits) sont transfectées avec 1,75 μ g du plasmide d'expression pCMX-HA-hPPAR β , 1,75 μ g de pCMX-mPGC-1 α et 1,05 μ g de pCMX-CBP (0.035 μ g pCDNA-hGHSR-1a est ajouté au besoin). Le milieu de culture est changé pour un milieu frais le lendemain matin. Un jour plus tard, les cellules sont traitées 30 minutes avec 10^{-7} M de ghréline acylée. Elles sont ensuite rincées avec du PBS froid puis récoltées dans 0,5 mL de PBS froid. La lyse est effectuée dans le même RIPA que les tests d'acétylation à l'exception du Triton X-100 remplacé par 0,5 % de IGEPAL et des inhibiteurs NAM et TSA qui ne sont pas présents. Trois expériences indépendantes ont été effectuées.

Les extraits lysés sont ensuite centrifugés dans le but d'enlever les débris cellulaires puis incubés à 4 °C pendant une nuit avec leur anticorps respectifs anti-HA (Roche) ou anti-MYC (hybridome 9E10). Le lendemain, les billes enrobées de protéines A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz) sont ajoutées pour 4 ou 5 h d'incubation à 4 °C.

Les immunoprécipités sont lavés dans le tampon de lyse, résolus par SDS-PAGE et analysés par immunoblot. Les membranes sont bloquées avec un réactif bloquant (Roche) dans une solution TBS 1X (*Tris-buffered saline*), sondé avec les anticorps primaires PGC-1 α (Santa Cruz), anti-HA (hybridome 12CA5), AcK²100 (Cell Signaling, anti-acétyl lysine) et les anticorps secondaires correspondants. Les signaux sont finalement visualisés sur des films d'autoradiographie avec une solution de révélation (Roche).

2.3 Test de stabilité protéique

Les cellules (plaque 6 puits) sont transfectées avec 1,75 μg du vecteur d'expression pCMX-HA-mPGC-1 α (0,035 μg de pCDNA-hGHS-R1a est ajouté selon les conditions). Le milieu de culture est changé pour un milieu frais le lendemain matin. Le lendemain, les cellules sont traitées avec du milieu frais contenant 50 μM de cycloheximide qui bloque la synthèse protéique. La ghréline acylée (10^{-7} M) est ajoutée au besoin. Les récoltes sont effectuées selon le temps indiqué (de 0 à 2 h) dans 0,5 mL de PBS froid. Les extraits protéiques sont ensuite lysés dans le même RIPA que les expériences de co-immunoprécipitation puis résolus par SDS-PAGE et analysés par immunoblot comme précédemment expliqué. Deux expériences indépendantes ont été effectuées

2.4 Test d'activité transcriptionnelle

Les cellules (plaque 24 puits) sont transfectées avec 500 ng de vecteur rapporteur (UAS-tk-Luciférase), 100 ng de plasmide d'expression d'intérêt (Gal4-mPGC-1 α ou Gal4-hPPAR β) et 200 ng de pCMX- β -gal dans un total de 1,5 μ g par puits (2 ng de plasmide pcDNA-hGHS-R1a est ajouté pour les cellules HEK293). Après 5 à 6 h de transfection, le milieu des cellules est remplacé avec du milieu frais contenant au besoin 10^{-7} M de ghréline acylée et/ou 1 μ M de GW0742 (Tocris). Après 16 h, les cellules sont lysées dans un tampon potassium phosphate contenant 1 % de Triton X-100. Ce test est réalisé pour déterminer les niveaux d'activité de la luciférase suite à l'addition de son substrat, la D-luciférine (Roche), et l'émission de lumière est mesurée avec un luminomètre (Wallac).

Les valeurs de luciférase sont normalisées par rapport à l'activité de la β -galactosidase et exprimées en activité luciférase relative. Les tests d'activité luciférase sont faits en triplicata et reproduits au moins trois fois. La comparaison des moyennes obtenues a été faite à l'aide du test *t* de Student pour données non-appariées grâce au logiciel GraphPad Prism 6. Les barres d'erreur des graphiques représentent l'erreur standard à la moyenne (SEM).

3 RESULTATS

L'hormone ghréline et le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α sont deux acteurs clés du métabolisme gluco-lipidique. Les modes de régulation de PGC-1 α sont variés et peuvent concerner sa stabilité, sa transcription, sa localisation cellulaire ou ses modifications post traductionnelles qui régulent à la fois son activité mais aussi sa capacité à lier ses partenaires (récepteurs nucléaires, coactivateurs ou répresseurs).

Afin de savoir si un traitement ghréline peut avoir un effet sur PGC-1 α , deux lignées ont été employées : des cellules embryonnaires de rein HEK293 dans lesquelles l'expression du récepteur GSH-R1a sera exogène et des hépatocytes carcinomiques HepG2.

3.1 La ghréline et son récepteur GHS-R1a modulent l'activité transcriptionnelle de PGC-1 α

La première étape de notre étude sur le rôle de la ghréline dans la régulation du coactivateur PGC-1 α a été d'évaluer l'activité transcriptionnelle de ce dernier, c'est-à-dire sa capacité à induire l'expression d'un gène cible, en réponse au traitement. Des tests d'activité de gène rapporteur à la luciférase (système Gal4/UAS) ont été effectués sur des cellules HEK293 traitées ou non à la ghréline (10^{-7} M) pendant 16 h en présence ou non du récepteur GHS-R1a. Deux plasmides d'expression ont été utilisés pour cotransfecter les cellules. Le premier, UAS-tk-Luciférase, est le gène rapporteur précédé d'une séquence activatrice de levure (UAS) en amont du promoteur minimal de la thymidine kinase (tk). Le second, Gal4-PGC-1 α , contient la région codante de PGC-1 α fusionnée au domaine de liaison à l'ADN Gal4 une protéine de levure qui reconnaît le UAS.

Les expériences démontrent une inhibition significative de PGC-1 α de près de 40 % en réponse à l'expression transitoire de GHS-R1a seul (**Figure 12**). Ceci met en évidence

l'activité constitutive de GHS-R1a qui a été démontrée dans la littérature et qui représente près de 50 % de son activité totale (Holst et al. 2003). Étonnamment, lors de l'ajout de son ligand naturel, nous observons une activation de PGC-1 α de 30 % qui suggère que la ghréline et GHS-R1a ne régulent pas PGC-1 α de la même façon. Cependant, cette augmentation de l'activité ne suffit pas à rétablir l'inhibition de PGC-1 α causée par GHS-R1a. Les traitements réalisés sur le rapporteur seul ainsi que sur Gal4-PGC-1 α en absence de GHS-R1a démontrent une absence de réponse (contrôles négatifs). Les contrôles des cellules transfectées avec le rapporteur seul en présence de GHS-R1a également effectués ne montrent pas d'effet significatif (données non présentées). Ceci permet de nous assurer, d'une part, que le promoteur de la thymidine kinase présent dans le gène rapporteur UAS-tk-Luciférase n'est pas sensible à la ghréline, et d'autre part, que les cellules HEK293 ne possèdent pas de récepteur reconnu par la ghréline. Nous concluons que le récepteur de la ghréline induit une forte inhibition de PGC-1 α tandis que l'ajout de la ghréline induit l'activation de PGC-1 α .

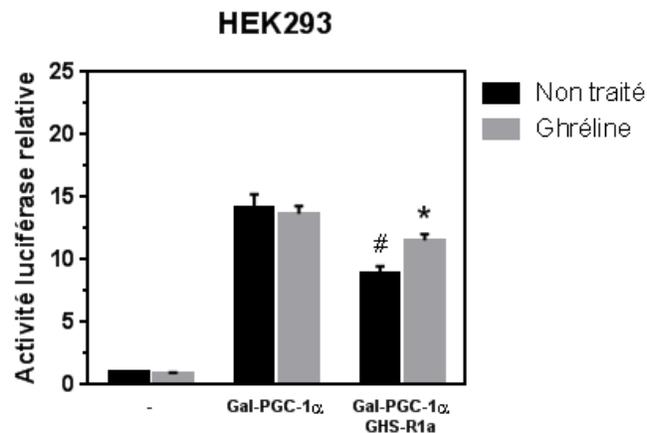


Figure 12. La ghréline active PGC-1 α tandis que GHS-R1a l'inactive

Les cellules HEK293 ont été transfectées avec les vecteurs UAS-tk-Luciférase avec ou sans Gal4-PGC-1 α en présence ou non de GHS-R1a. Le traitement a été effectué avec 10^{-7} M de ghréline pendant 16 h. Les valeurs sont normalisées selon l'activité β -galactosidase et exprimées en activité relative selon la condition non traitée

sans Gal4-PGC-1 α . Le graphique représente les moyennes \pm SEM de valeurs en triplicata d'au moins trois expériences indépendantes. (*) $p < 0.05$ selon la condition non traitée ; (#) $p < 0.05$ selon la condition non traitée sans GHS-R1a.

3.2 Le récepteur GHS-R1a induit l'acétylation de PGC-1 α

Plusieurs études ont été réalisées sur la régulation de l'activité transcriptionnelle de PGC-1 α . Il est reconnu que l'acétylation de PGC-1 α réduit son activité de façon significative (Lerin et al. 2006). De plus, l'acétylation est une modification post-traductionnelle directement liée au statut énergétique de la cellule. Nous nous sommes alors intéressés à l'effet de la ghréline et de son récepteur sur l'acétylation de PGC-1 α . Pour cela des expériences d'immunoprécipitation de PGC-1 α suivies d'analyses en Western avec un anticorps anti-acétyl-lysine ont été réalisées.

Dans un premier temps, nous avons voulu évaluer l'impact du GHS-R1a seul dans les cellules HEK293 (**Figure 13**). Un traitement aux inhibiteurs de désacétylases (TSA/NAM) a été utilisé en tant que contrôle positif du signal d'acétylation. Les résultats démontrent une augmentation significative de l'acétylation de PGC-1 α estimée à 3,5 fois en réponse au GHS-R1a et à 10,5 fois en présence de TSA/NAM comparativement à la situation contrôle (**Figure 13A**). De plus, cet effet est dose-dépendant selon la quantité de GHS-R1a utilisée (**Figure 13B**). Ces résultats sont cohérents avec ceux mesurant l'activité transcriptionnelle en test d'activité luciférase (**Figure 12**). Il est donc probable que l'inhibition de PGC-1 α dans les cellules HEK293 par le GHS-R1a soit conséquente d'une augmentation de son acétylation.

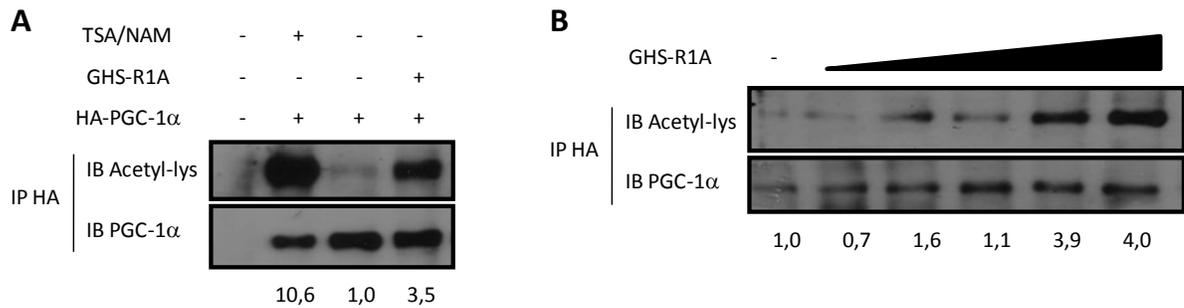


Figure 13. GHS-R1a induit l'acétylation de PGC-1 α

Les cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides d'expression HA-PGC-1 α et CBP en présence ou en absence de GHS-R1a. Les extraits cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre le tag HA et l'acétylation a été détectée avec un anticorps anti-acétyl-lysine. Les chiffres indiquent la quantification du niveau d'acétylation de PGC-1 α relatif au niveau protéique de PGC-1 α total. Au moins trois expériences indépendantes ont été effectuées. **(A)** Les cellules ont été traitées 6 h avec 1 μ M de trichostatine A et 10 mM de nicotinamide (inhibiteurs de désacétylases) en tant que contrôle positif. La quantité de GHS-R1a utilisée est de 0,1 μ g par puits. **(B)** Les cellules ont été transfectées avec des doses croissantes de GHS-R1a (de 0 à 0,1 μ g par puits).

Nous avons par la suite déterminé l'effet de la ghréline sur les niveaux d'acétylation de PGC-1 α dans les cellules HEK293 en présence de GHS-R1a (**Figure 14**). Après avoir traité les cellules avec 10^{-7} M de ghréline pendant 30 minutes, des expériences d'immunoprécipitation suivies d'analyses Western ont été réalisées comme précédemment. Étonnamment, nous constatons, d'après ces expériences, que la ghréline n'a pas provoqué d'effet significatif sur l'acétylation de PGC-1 α . L'activation du PGC-1 α en réponse à l'hormone observée dans les tests d'activité luciférase n'est donc pas la résultante d'une réduction de l'acétylation.

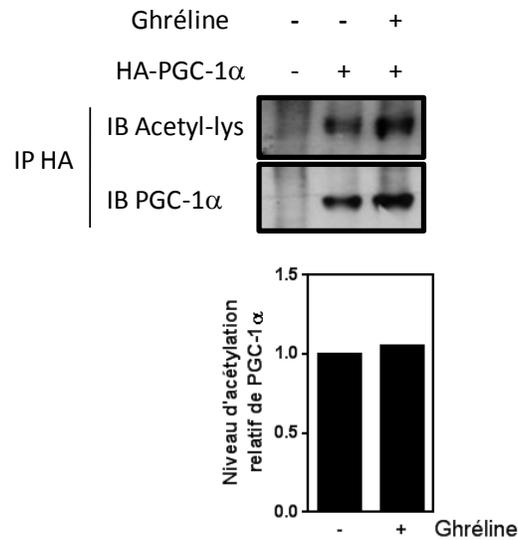


Figure 14. L'acétylation de PGC-1 α n'est pas modulée par la ghréline

Les cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides d'expression HA-PGC-1 α et CBP en présence ou en absence de GHS-R1a. Les traitements ont été réalisés avec 10^{-7} M de ghréline durant 30 minutes. Les extraits cellulaires ont été ensuite immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre le tag HA et l'acétylation a été détectée avec un anticorps anti-acetyl-lysine. Trois expériences indépendantes ont été effectuées. Le graphique représente la quantification des bandes normalisées selon les niveaux protéiques de PGC-1 α total.

En conclusion, GHS-R1a augmente les niveaux d'acétylation de PGC-1 α tandis que la ghréline n'a pas d'effet. Ces résultats corrént avec l'action de la ghréline qui semble différente de celle de GHS-R1a. De plus, le processus d'acétylation semble requis dans l'effet inhibiteur de PGC-1 α .

3.3 L'activité constitutive du récepteur de la ghréline protège PGC-1 α d'une dégradation indépendante de l'ubiquitination

Outre les modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, la stabilité protéique est également un mode de régulation de PGC-1 α . Nous nous sommes alors intéressés en premier lieu aux niveaux protéiques de PGC-1 α en réponse au GSH-R1a et à la ghréline. Des analyses en Western dans les cellules HEK293 nous ont permis de constater une importante accumulation de PGC-1 α de 172 à 228 % en présence du récepteur, et ce, de façon dose-dépendante comparativement à la condition contrôle (**Figure 15A**). Une fois de plus, ceci suggère que l'activité constitutive du GHS-R1a engendre un effet significatif sur PGC-1 α . Il est également intéressant de constater que la ghréline, contrebalance l'activité de son récepteur en réduisant modérément l'accumulation du coactivateur de 17 à 23 % selon la concentration utilisée de GHS-R1a. En absence de GHS-R1a, la quantité protéique de PGC-1 α , suite au traitement ghréline, ne semble pas être modulée significativement. Ceci confirme une fois de plus l'absence de réponse des cellules HEK293 à la ghréline en absence de récepteur.

Il a été démontré dans la littérature que l'acétyltransférase GCN5 permettait d'acétyler et ainsi réduire l'activité transcriptionnelle de PGC-1 α (Lerin et al. 2006), ce que nous avons également confirmé dans nos expériences (résultats non présentés). Comme nous avons vu précédemment, l'expression du récepteur GHS-R1a provoque l'acétylation et la désactivation de PGC-1 α . Nous avons donc voulu déterminer si la capacité de GHS-R1a à augmenter les niveaux protéiques de PGC-1 α était commune à GCN5. Pour cela nous avons co-transfecté les cellules HEK293 avec HA-PGC-1 α et GCN5 puis nous avons analysé les extraits protéiques en Western blot (**Figure 15B**). Il s'avère que l'expression de GCN5, en présence de GHS-R1a, fait accumuler également les quantités de

PGC-1 α de l'ordre de 250 %. Ceci est également observé en absence de GHS-R1a (résultats non présentés).

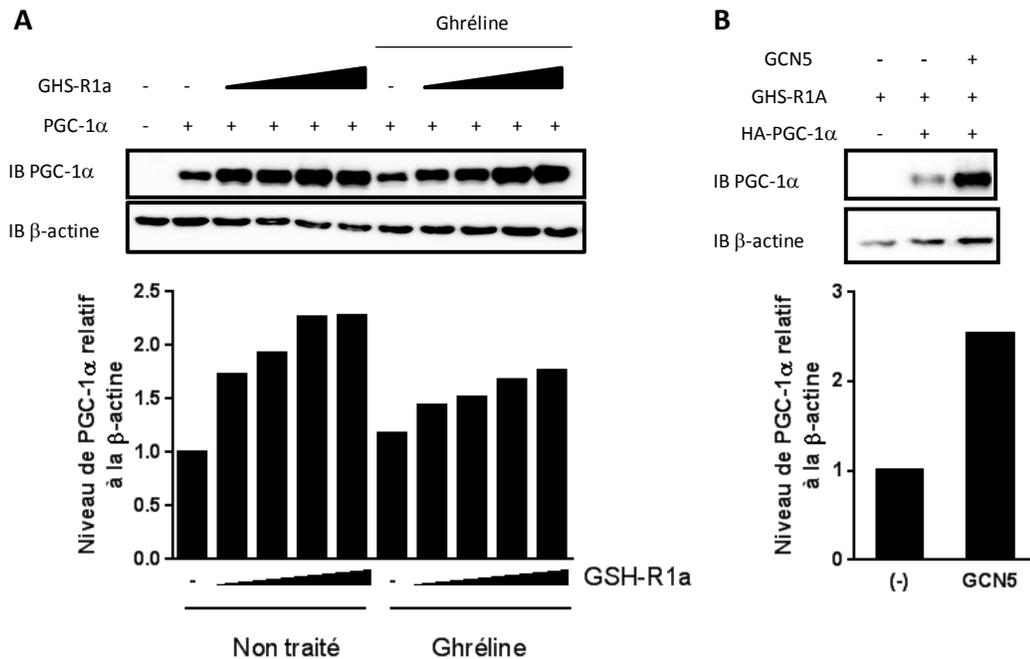


Figure 15. GHS-R1a et GCN5 engendrent l'accumulation de PGC-1 α

Les cellules HEK293 ont été transfectées avec HA-PGC-1 α et CBP. (A) Le vecteur d'expression de GHS-R1a (de 0 à 4 ng) est ajouté. (B) Le plasmide de GCN5 est ajouté. Les cellules ont été traitées ou non avec 10^{-7} M de ghréline pendant 30 minutes puis les extraits protéiques ont été analysés en Western et révélés avec un anticorps dirigé contre PGC-1 α ou β -actine. Plus de trois expériences indépendantes ont été effectuées. Les graphiques représentent la quantification des bandes normalisées selon la β -actine puis rapportées à la condition non traitée et sans GHS-R1a ou sans GCN5.

Afin de savoir si l'accumulation de PGC-1 α révèle une augmentation de la stabilité protéique, nous avons effectué des tests de stabilité (**Figure 16**). Il s'agit de traiter les cellules à la cycloheximide avec ou sans traitement ghréline puis de les récolter à des temps précis (de 0 à 2 h). La cycloheximide est un composé chimique qui bloque la traduction protéique. Ainsi, pour un temps t , il est possible de rapporter la quantité protéique observée en Western blot à celle du temps 0 après avoir normalisé les niveaux avec la β -actine. Ces expériences nous permettent de déterminer les niveaux de dégradation. L'action du GHS-R1a seul révèle une forte stabilisation de PGC-1 α dont le temps de demi-vie augmente de 0,3 h à plus de 2 h. A contrario et de façon moins significative, la ghréline déstabilise PGC-1 α jusqu'à un temps de demi-vie de 1 h 45.

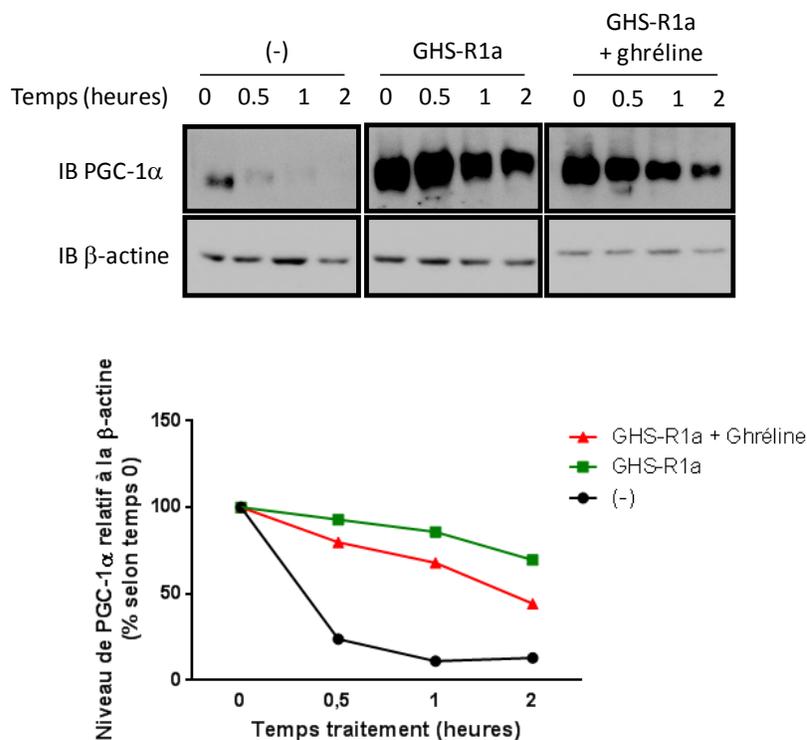


Figure 16. GHS-R1a stabilise PGC-1 α

Les cellules HEK293 ont été transfectées avec HA-PGC-1 α et CBP en présence ou en absence de GHS-R1a. Les cellules ont été traitées à la cycloheximide (50 μ M) et traitées ou non à la ghréline (10^{-7} M) pendant le

temps indiqué. Les extraits cellulaires ont été analysés en Western et révélés avec un anticorps dirigé contre PGC-1 α ou la β -actine. Deux expériences indépendantes ont été effectuées. Le graphique représente la quantification des bandes normalisées par rapport à la β -actine puis rapportées au temps 0 indépendamment fixé à 100 % pour chacune des conditions.

Nous avons voulu, par la suite, déterminer si l'action de GHS-R1a était dépendante de l'état d'ubiquitination de PGC-1 α (**Figure 17**). Il est connu que la dégradation protéique est effectuée selon différents systèmes dont celui du protéasome de façon dépendante ou indépendante de l'ubiquitine. Des expériences d'immunoprécipitation suivies d'analyses Western ont donc été réalisées en présence de PGC-1 α (tagué MYC) et d'ubiquitine (tagué HA) en réponse ou non à GHS-R1a. Les conditions MYC-PGC-1 α seul, HA-Ubi seul et non transfecté sont utilisées comme contrôle de spécificité du signal. Les cellules ont été traitées 16 h au MG132 pour inhiber la dégradation protéasome-dépendante de PGC-1 α et préserver l'intégrité de PGC-1 α ubiquitiné. Un traitement de 30 minutes est ensuite effectué avec 10^{-7} M de ghréline. A l'aide d'un anticorps anti-MYC, PGC-1 α est immunoprécipité puis les extraits cellulaires sont analysés en Western blot et révélés avec un anticorps anti-HA. La quantité totale de PGC-1 α est également révélée avec un anticorps anti-PGC-1 α comme contrôle. En prenant en considération le contrôle de PGC-1 α total présent dans l'extrait, nous n'avons constaté aucune différence significative des niveaux d'ubiquitination entre les différentes conditions (**Figure 17**).

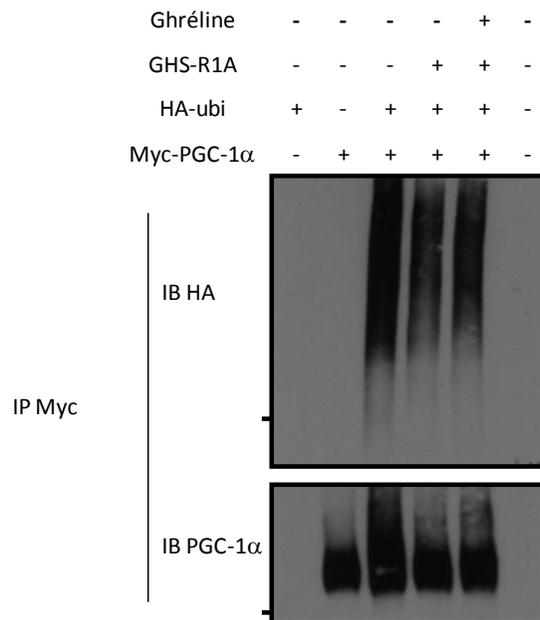


Figure 17. L'ubiquitination de PGC-1 α n'est pas modulée par la ghréline ou son récepteur

Les cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides d'expression MYC-PGC-1 α et HA-Ubi en présence ou en absence de GHS-R1a. Les extraits cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre le tag MYC et l'ubiquitination a été détectée avec un anticorps anti-HA. Trois expériences indépendantes ont été effectuées.

En conclusion, les résultats suggèrent que GHS-R1a stabilise PGC-1 α de façon indépendante de l'ubiquitine. Néanmoins cette stabilisation ne semble pas corrélée avec l'inhibition observée en test d'activité transcriptionnelle.

3.4 La ghréline diminue l'interaction PGC-1 α /PPAR β et réduit la capacité de coactivation de PGC-1 α envers PPAR β

Les partenaires d'interaction de PGC-1 α décrits dans la littérature sont nombreux et régulent une panoplie de gènes impliqués dans plusieurs voies métaboliques telles que la β -oxydation des acides gras ou la gluconéogenèse. Afin de corréler l'effet de la ghréline sur l'activité de PGC-1 α avec un effet potentiel de régulation sur ses partenaires d'interaction, nous avons étudié son rôle dans un contexte dépendant du partenaire coactivé dans les cellules HEK293 et dans les cellules d'hépatocytes HepG2. Les résultats concernant le récepteur nucléaire *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR β) sont présentés ici.

Nous avons, dans un premier temps, mesuré l'interaction de PGC-1 α avec son partenaire PPAR β . Nous avons donc réalisé des expériences de co-immunoprécipitation sur des extraits protéiques de cellules transfectées avec les plasmides codants pour HA-PPAR β et PGC-1 α (les conditions où l'un des deux vecteurs est transfecté seulement ont été utilisées comme contrôles). Le partenaire PPAR β est immunoprécipité puis le complexe est analysé en Western blot où PGC-1 α est révélé (la révélation de PPAR β a également été réalisée pour la normalisation). Ces expériences nous révèlent une forte diminution de l'interaction PGC-1 α /PPAR β en présence de quantité croissante de ghréline soient 10^{-8} M et 10^{-7} M (**Figure 18**). L'interaction PGC-1 α /PPAR β n'est pas visible dans la condition où les cellules ne sont pas transfectées avec GHS-R1a. Ceci pourrait révéler la nécessité d'un signal pour que PGC-1 α interagisse avec PPAR β . Il est possible également que l'accumulation de PGC-1 α en réponse au GHS-R1a favorise l'observation de l'interaction. Le contrôle de révélation de PPAR β immunoprécipité nous assure une normalisation adéquate.

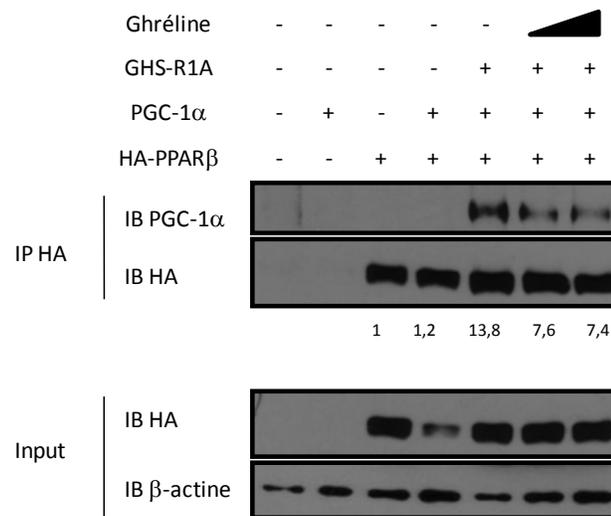


Figure 18. La ghréline réduit l'interaction PGC1 α /PPAR β

Les cellules HEK293 ont été transfectées avec HA-PPAR β , PGC-1 α et CBP en présence ou non du GHS-R1a. Les extraits cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre le tag HA. PGC-1 α interagissant avec PPAR β a été détectée avec un anticorps anti-PGC-1 α . Les traitements ghréline sont effectués à des concentrations de 10^{-8} M et 10^{-7} M pendant 30 minutes. Les chiffres indiquent la quantification du niveau protéique de PGC-1 α relatif au niveau protéique de PPAR β . Trois expériences indépendantes ont été effectuées.

Par la suite, nous avons déterminé si la diminution de l'interaction PGC-1 α /PPAR β corrélait avec l'activité transcriptionnelle de PPAR β . Pour cela, nous avons réalisé des tests d'activité luciférase en présence ou non de PGC-1 α dans des cellules traitées ou non à la ghréline et/ou au GW0742 qui est un agoniste de PPAR β (**Figure 19**). Afin de bénéficier d'un contexte cellulaire hépatique, ces expériences ont été effectuées avec des cellules HepG2 qui ont été transfectées avec Gal4-PPAR β ainsi que le gène rapporteur UAS-tk-Luciférase. Nous avons observé que la présence de PGC-1 α augmente l'activité de PPAR β de près de 28 fois en absence de traitement, démontrant ainsi la capacité de PGC-1 α à coactiver PPAR β de façon indépendante au GW0742 (**Figure 19**). Lorsque les cellules sont traitées au GW0742, l'activité de PPAR β augmente de 4 fois et la capacité de coactivation

de PGC-1 α s'élève à 23 fois. Le traitement de ghréline ne module pas l'action de PGC-1 α sur PPAR β en absence de GW0742. Toutefois lorsque la ghréline est ajoutée au GW0742, nous constatons une tendance vers une diminution de la coactivation de PPAR β via PGC-1 α de plus de 50 % quoique ceci ne soit pas significatif dans ces conditions.

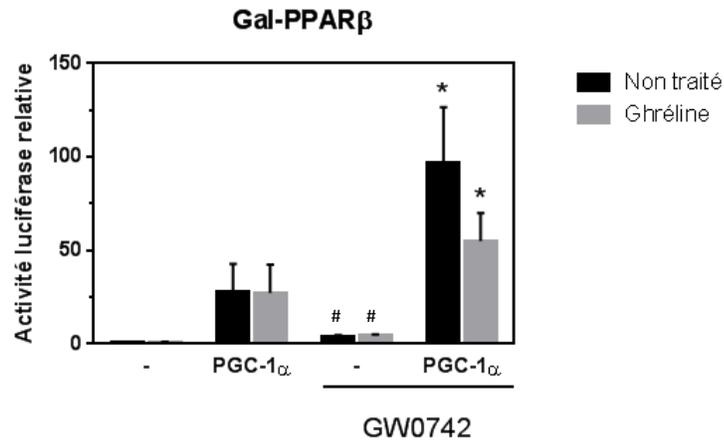


Figure 19. La ghréline réduit la capacité de PGC-1 α à coactiver PPAR β de façon ligand-dépendante

Les cellules HepG2 ont été transfectées avec les vecteurs UAS-tk-Luciférase et Gal4-PPAR β avec ou sans PGC-1 α . Le traitement a été effectué avec 10^{-7} M de ghréline pendant 16 h. Les valeurs sont normalisées selon l'activité β -galactosidase et exprimées en activité relative selon la condition non traitée sans PGC-1 α . Le graphique représente les moyennes \pm SEM de valeurs en triplicata d'au moins trois expériences indépendantes. (*) $p < 0.05$ selon les conditions sans PGC-1 α ; (#) $p < 0.05$ selon la condition non traitée au GW0742.

En conclusion, la ghréline semble diminuer l'action de PGC-1 α vis-à-vis de son partenaire PPAR β tant pour l'interaction protéique que pour la capacité à coactiver. Ceci ne coïncide pas avec le test d'activité transcriptionnelle (**Figure 12**). L'effet de la ghréline sur PGC-1 α est peut être dépendant du partenaire étudié. Ce qui expliquerait que l'effet de la ghréline sur l'activité de PGC-1 α soit modéré (**Figure 12**).

4 DISCUSSION

Le syndrome métabolique est la manifestation pathologique d'un surplus énergétique. Il est primordial d'améliorer les connaissances sur ce sujet pour développer, dans l'avenir, des cibles thérapeutiques. Les objectifs de notre étude ont été de définir et de caractériser le rôle de la ghréline et de son récepteur dans la régulation du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α .

De nombreuses études démontrent l'importance de la ghréline et du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Notre laboratoire a déjà mis en évidence l'axe Ghréline/GHS-R1a/PPAR γ dans les macrophages (Demers et al. 2009). Aucune donnée n'est disponible sur l'existence d'un axe de régulation ghréline/GHS-R1a/PGC-1 α .

Nos résultats démontrent que le récepteur GHS-R1a est impliqué dans l'inhibition, l'acétylation et la stabilisation de PGC-1 α de façon significative et dose-dépendante. A l'inverse la ghréline active faiblement PGC-1 α . L'acétylation de PGC-1 α ne semble pas être modulée tandis que la stabilité est légèrement réduite en réponse à la ghréline (des expériences supplémentaires permettraient d'en déterminer la significativité). L'effet inhibiteur de GHS-R1a sur PGC-1 α corrèle avec le processus d'acétylation de PGC-1 α . L'effet de stabilisation de PGC-1 α semble être indépendant de l'ubiquitine. De plus, la ghréline inhibe l'interaction PGC-1 α /PPAR β en absence d'un agoniste de PPAR β . La ghréline réduit également la capacité de coactivation de PGC-1 α sur PPAR β dans les cellules HepG2 de façon ligand-dépendante.

4.1 Implication du récepteur GHS-R1a et de la ghréline dans la régulation de PGC-1 α

Une partie des expériences qui composent cette étude ont été réalisées dans un système hétérologue utilisant les cellules embryonnaires de rein HEK293 où le récepteur GHS-R1a et le coactivateur PGC-1 α sont surexprimés. Cette approche nous permet déterminer le rôle de l'activité constitutive intrinsèque du récepteur indépendamment de l'effet de la ghréline. La plupart des GPCR atteignent un état d'activation en absence de ligand, ce qui engendre une signalisation fonctionnelle (Costa et al. 2005). Le récepteur de la ghréline possède également cette activité constitutive. D'après des mesures de concentration en IP₃ intracellulaire dans les cellules HEK293 transfectées, cette activité est estimée à 50 % de son activité maximale (Holst et al. 2003). Cette capacité est intrinsèque à GHS-R1a et indépendante du contexte cellulaire puisque des résultats similaires ont été observés dans un contexte *in vitro* de disque lipidique (Damian et al. 2012).

4.1.1 Rôle de GHSR-1a dans la régulation de PGC-1 α

Au cours de nos expériences, nous avons constaté un effet significatif d'expression de GHSR-1a sur PGC-1 α . Des tests d'activité de gène rapporteur à la luciférase et des tests d'acétylation ont révélé un effet inhibiteur de GHS-R1a sur PGC-1 α caractérisé par une diminution de l'activité transcriptionnelle et une augmentation de l'acétylation (**Figures 12 et 13**). Ces effets sont partagés avec la surexpression de l'acétyltransférase GCN5, connue pour acétyler et inhiber PGC-1 α (Lerin et al. 2006). De plus, GHS-R1a engendre l'accumulation protéique de PGC-1 α , tout comme le fait GCN5 (**Figure 15**). Il est donc envisageable que GCN5 soit impliqué dans la signalisation ligand-indépendante de

GHS-R1a. Pour vérifier cela, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'expression du récepteur de la ghréline sur l'interaction entre PGC-1 α et GNC5.

D'après les résultats des **figures 16 et 17**, nous avons également observé que GHS-R1a protège PGC-1 α d'une dégradation indépendante de l'ubiquitine par le protéasome. Une récente étude sur la dégradation de PGC-1 α n'impliquant pas l'ubiquitine a révélé que la stabilité de ce coactivateur peut être régulée par NQO1 activée dans le foie lorsque la quantité de NADH augmente (Adamovich et al. 2013). Il s'agit d'une protection contre la dégradation par défaut de PGC-1 α . Ainsi, dans le contexte de nos résultats, la diminution du ratio NAD/NADH serait impliquée dans la signalisation de GHS-R1a et les conséquences sur la stabilité de PGC-1 α . Il est peu probable que cette action soit directe. Néanmoins, il est possible que les effets de GHS-R1a sur la consommation énergétique de la cellule mènent à une augmentation des voies cataboliques ou à une réduction de la phosphorylation oxydative (via une régulation génique). Ceci expliquerait également l'effet de GHS-R1a sur l'acétylation de PGC-1 α puisqu'effectivement la désacétylase Sirt1 est désactivée suite à la diminution du ratio NAD/NADH (Houtkooper et al. 2010). Sirt1 est la seule désacétylase connue de PGC-1 α (Nemoto et al. 2005, Rodgers et al. 2005). Une mesure du ratio NAD/NADH ainsi qu'une analyse de l'interaction entre Sirt1 et PGC-1 α pourraient être réalisées pour confirmer ces hypothèses. La **figure 20** représente schématiquement ce modèle. Il est important de préciser que les expériences de cette étude reflètent les analyses effectuées sur PGC-1 α exogène placé sous le contrôle du promoteur T7. L'expression de PGC-1 α n'est donc pas soumise aux régulations transcriptionnelles.

4.1.2 Rôle de la ghréline dans l'activation de PGC-1 α

La ghréline a été décrite comme ligand endogène qui engendre l'activation de son récepteur GHS-R1a (Kojima et al. 1999). Ces expériences ont été effectuées sur la base d'un système hétérologue mesurant l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire engendrée suite à l'activation du récepteur. Étonnamment, les tests d'activité luciférase de notre étude révèlent une action compensatoire de la ghréline sur son récepteur qui se traduit par une augmentation de l'activité de PGC-1 α diminuée en présence de GHS-R1a seul (**Figure 12**). Cet effet inverse de la ghréline sur PGC-1 α pourrait être expliqué par une signalisation indépendante de l'activité constitutive du récepteur (non induite en condition basale). En effet la transduction du signal de GHS-R1a peut être effectuée par l'utilisation de différentes voies intracellulaires qui varient selon la présence ou non de son ligand. Il a été démontré, dans les cellules HEK293, que la stimulation du récepteur par la ghréline engendre l'activation de la voie des MAPKs, en phosphorylant notamment *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK 1/2), non activée en condition basale (**Figure 20**) (Chu et al. 2007). Le rôle activateur de Sirt1 sur la phosphorylation de ERK a déjà été observée dans les cellules HEK293 (Li et al. 2008). Ceci est cohérent avec notre hypothèse, précédemment exposée, sur le rôle du GHS-R1a dans la diminution du ratio NAD/NADH qui inhiberait Sirt1 et donc réduirait la phosphorylation de ERK. Dans ce sens, Il est envisageable que la signalisation suite à liaison de la ghréline au GHS-R1a module d'autres facteurs de régulation qui peuvent par la suite agir sur PGC-1 α . Par exemple, la voie des MAPKs peut moduler l'activité de régulateurs encore inconnus de PGC-1 α .

Nous savons que la ghréline et PGC-1 α ont des actions similaires (ils induisent tout deux la gluconéogenèse) mais aussi métaboliquement opposées (PGC-1 α induit la β -oxydation tandis que la ghréline favorise le stockage des acides gras). Concernant la ghréline, seuls les effets sur la gluconéogenèse ont été reportés dans les systèmes cellulaires, ce qui implique que la régulation du métabolisme lipidique hépatique ne serait

pas directe (Rigault et al. 2007). Nous supposons donc que l'activation de PGC-1 α par la ghréline pourrait être un signal de régulation de la gluconéogenèse. Il se peut également que l'effet observé soit la résultante de diverses actions dépendantes des voies métaboliques impliquées.

Afin de corrélérer l'activité transcriptionnelle de PGC-1 α avec son état d'acétylation, nous avons effectué des expériences d'immunoprécipitation suivies d'analyses Western pour déterminer les niveaux d'acétylation de PGC-1 α en réponse à la ghréline (**Figure 14**). Il s'est avéré que la ghréline ne module pas l'état d'acétylation de PGC-1 α dans nos conditions. Au vu de l'activation qui est constatable dans les tests d'activité luciférase nous aurions pu nous attendre à une réduction de l'acétylation du coactivateur. Cependant, nous savons qu'il est fortement possible que la voie de signalisation engendrée par la ghréline soit différente de celle de son récepteur GHS-R1a, comme suggéré précédemment. La régulation post traductionnelle de PGC-1 α est complexe et implique plusieurs types de modifications telles que la phosphorylation, la méthylation, l'ubiquitination, la SUMOylation, la GlcNAcylation ou l'acétylation (Rytinki et al. 2009, Fernandez-Marcos et al. 2011). De nombreux sites activateurs de phosphorylation de PGC-1 α ont été identifiés et peuvent agir comme cibles en réponse à la signalisation de la ghréline. D'autre part, certains sites de phosphorylation ont été décrits comme étant négatifs. L'analyse de cette modification post-traductionnelle en Western blot nécessite l'utilisation d'anticorps spécifiques. Or, actuellement, le seul anticorps spécifique qui existe cible le site de phosphorylation négatif par la kinase AKT (Ser571). Des inhibiteurs spécifiques tels que le H89 ou PKAI (pour PKA), le composé C (pour AMPK), le SB203580 (pour p38MAPK) pourraient être utilisés pour déterminer le rôle respectif des différentes voies de kinase dans un contexte d'analyse Western avec un anticorps de révélation anti-serine ou thréonine.

L'ensemble des expériences de cette étude ont été réalisées avec des cellules cultivées dans un milieu de culture contenant du FBS et traitées avec une concentration pharmacologique de la ghréline. Il est intéressant de se demander si le sérum contenu dans le milieu pourrait interférer avec nos résultats. Bien qu'inactivé, le sérum peut possiblement moduler la stabilité de la ghréline ou être responsable de l'ajout de ghréline à une concentration physiologique. Afin de s'assurer de cet effet, nous avons effectué des expériences préliminaires sans sérum qui ont conforté les résultats obtenus en présence de FBS. Nous considérons donc que la présence du FBS n'interfère pas avec nos observations. La concentration de ghréline utilisée peut également avoir un rôle dans les effets que nous constatons. La concentration de 10^{-7} M, communément utilisée dans la littérature, correspond au maximum d'activité du récepteur GHS-R1a (Holst et al. 2003, Holliday et al. 2007). Lors de nos expériences préliminaires, nous avons testé des concentrations de l'ordre de 10^{-15} M (concentration physiologique) à 10^{-7} M. Il s'avère que, dans le cadre de la régulation de PGC-1 α , nous obtenons un maximum d'effet lorsque nous traitons les cellules avec la ghréline à une concentration de 10^{-7} M.

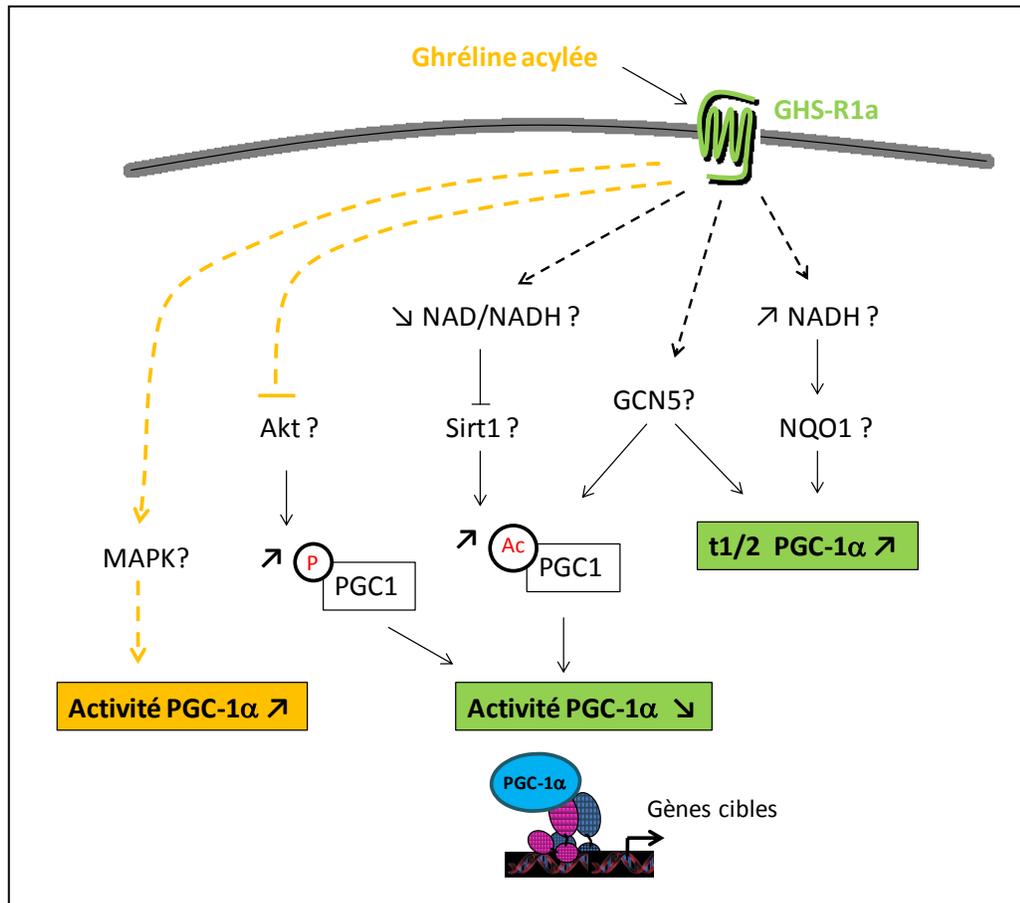


Figure 20. Modèle proposé du rôle de GHS-R1a et de la ghréline dans la régulation de PGC-1α

Les flèches pointillées noires représentent les effets supposés du récepteur de la ghréline (GHS-R1a). Les flèches pointillées orange représentent les effets supposés suite au traitement à la ghréline. Les modifications post-traductionnelles de PGC-1α indiquées en rouge (ac ; acétylation et P ; phosphorylation) inhibent l'activité transcriptionnelle de PGC-1α.

4.2 Implication de la ghréline dans la coactivation de PPAR β via PGC-1 α

Dans la dernière partie de cette étude, nous avons voulu déterminer si l'effet activateur de la ghréline sur PGC-1 α bénéficiait à la coactivation d'un de ses partenaires d'interaction : PPAR β . Il s'agit d'un récepteur nucléaire ubiquitaire principalement impliqué dans la régulation de l'homéostasie gluco-lipidique au sein des tissus métaboliques. L'analyse est effectuée au niveau de l'interaction protéique entre PGC-1 α et PPAR β puis au niveau de la coactivation de PPAR β en présence ou non de PGC-1 α en réponse à la ghréline.

4.2.1 La ghréline et l'interaction PGC-1 α /PPAR β

D'après nos expériences de co-immunoprécipitation, il s'avère que l'interaction entre PGC-1 α et PPAR β est fortement augmentée en réponse au GHS-R1a et réduite par un traitement à la ghréline (**Figure 18**). Au vu des résultats obtenus sur l'activité de PGC-1 α , nous nous attendions à un effet négatif du récepteur et un effet positif de la ghréline, voir pas d'effets du tout. La capacité de PGC-1 α à lier PPAR β avait été démontré dans les cellules HEK293 et les cellules musculaire C2C12 (Wang et al. 2003). Malheureusement, nous ne savons pas si cet effet persiste en présence d'un agoniste de PPAR β (nos expériences ne comprennent pas assez de données pour émettre une conclusion). L'implication du GHS-R1a semble corrélérer avec l'accumulation protéique de PGC-1 α . Afin de confirmer cette explication, il serait nécessaire d'évaluer la quantité protéique totale de PGC-1 α dans nos expériences de co-immunoprécipitation. Quant au rôle de la ghréline, il est possible que la régulation de PGC-1 α soit dépendante du partenaire coactivé. Les rôles opposés de la ghréline et de PPAR β tels que l'induction et la réduction

de la gluconéogenèse (Gauna et al. 2005, Bojic et al. 2013) peuvent expliquer la régulation négative de l'interaction PGC-1 α /PPAR β . Afin de confirmer cette explication, nous avons voulu déterminer si la diminution de cette interaction engendre l'inhibition de l'activité de PPAR β . C'est pour cela que nous nous sommes intéressés à la capacité de coactivation de PPAR β par PGC-1 α dans la lignée d'hépatome humain HepG2.

Le foie est un organe primordial dans la régulation du métabolisme gluco-lipidique. Lors de jeûne, il permet le maintien de la glycémie grâce à ses capacités d'hydrolyse du glycogène (glycogénolyse) et de production de glucose (gluconéogenèse). Il produit également de l'énergie grâce à l'utilisation des acides gras (β -oxydation). Au vu de l'importance de la ghréline et de PGC-1 α dans le maintien de l'homéostasie énergétique, le foie est un organe de choix pour étudier le rôle de la ghréline dans la régulation de PGC-1 α .

4.2.2 La ghréline et la capacité de coactivation de PGC-1 α envers PPAR β

Nous avons réalisé des tests d'activité luciférase sur les cellules HepG2 traitées ou non à la ghréline et/ou au GW0742 (agoniste de PPAR β) en présence ou non de PGC-1 α (**Figure 19**). Ces expériences révèlent que, de façon basale, la capacité de coactivation de PGC-1 α sur PPAR β est importante, soit de l'ordre de 28 fois. Bien que les valeurs globales ne soient pas significatives (p value de 0,1244), la capacité de coactivation de PGC-1 α a été constatée dans la totalité des expériences réalisées dans des ordres de grandeurs variables. En présence de l'agoniste GW0742, nous observons une augmentation significative de l'activité de PPAR β de l'ordre de 4 fois et une réponse à la coactivation de PGC-1 α de l'ordre de 23 fois comparativement aux cellules non traitées. Présentement, aucune donnée dans la littérature n'est disponible pour conforter ces valeurs. Cependant, nos résultats

corrèlent avec ceux des tests d'activité luciférase effectués à partir de cellules musculaires transfectées par PPRE-Luciférase (élément de séquence reconnu par PPAR β fusionné au gène rapporteur) qui révèlent une coactivation par PGC-1 α augmentée de façon ligand-dépendante, comparativement au contrôle PPRE-tk-Luciférase en présence de PGC-1 α seul (sans PPAR β) (Dressel et al. 2003). Dans ce contexte, il est possible que PGC-1 α coactive d'autres partenaires endogènes qui reconnaissent PPRE (notamment les autres isoformes PPAR). Nos expériences sont effectuées avec un gène rapporteur UAS-tk-Luciférase dont l'élément UAS, uniquement reconnu par le domaine de liaison à l'ADN Gal4, qui permet d'obtenir un signal indépendant des récepteurs nucléaires endogènes. Il serait tout de même intéressant d'ajouter dans nos expériences d'activité luciférase un contrôle composé de UAS-tk-Luciférase et de PGC-1 α seul.

Dans ce contexte, l'ajout de la ghréline ne provoque pas d'effet significatif sur la coactivation de PPAR β par PGC-1 α ni sur l'activité de PPAR β (absence d'agoniste). Ces résultats ne semblent donc pas corrélés avec la diminution de l'interaction PGC-1 α /PPAR β par la ghréline dans les cellules HEK293. Des explications possibles concernant ces résultats seront exposées dans la section 4.2.3.

D'après la **figure 19**, nous constatons que lorsque GW0742 est ajouté en présence de ghréline, la coactivation de PPAR β par PGC-1 α est réduite de plus de 50 %. Bien que ces résultats ne soient pas significatifs (p value de 0.2548), cette diminution nous indique qu'il est probable que la ghréline réduise la capacité de PGC-1 α à coactiver PPAR β dans un contexte ligand-dépendant. Ces résultats peuvent être expliqués par deux phénomènes. D'une part l'action de l'agoniste qui pourrait favoriser la liaison de PPAR β avec un autre partenaire moins présent et d'autre part, l'action de la ghréline qui pourrait favoriser la liaison de PGC-1 α avec d'autres récepteur nucléaire. Lorsque ces deux actions se produisent en même temps, un effet est constatable. Une étude récente portant sur le rôle de PPAR β dans le foie suggère que les interactions PPAR β /PGC-1 β et PPAR α /PGC-1 α seraient favorisées plutôt que PPAR β /PGC-1 α (Liu et al. 2011). Effectivement, PGC-1 β et

PPAR β semble jouer tous deux un rôle inducteur sur la synthèse des acides gras tandis que PPAR α et PGC-1 α augmente la β -oxydation. La coactivation de PPAR β par PGC-1 β étant ligand-dépendante, il est possible qu'elle interfère avec ce que l'on observe dans nos expériences. De plus, PPAR α , connu pour être un autre partenaire de PGC-1 α , est fortement exprimé dans les hépatocytes. Un autre partenaire qui pourrait également bénéficier de la coactivation de PGC-1 α est HNF4. La ghréline et HNF4 sont tous les deux impliqués dans l'augmentation de la gluconéogenèse du foie (Yoon et al. 2001, Murata et al. 2002). Pour vérifier ces hypothèses, il est donc nécessaire d'investiguer la coactivation de PPAR α et de HNF4 par PGC-1 α en réponse à la ghréline.

4.2.3 Effet de la ghréline sur le couplage PGC-1 α /PPAR β

D'un point de vue global, l'effet de la ghréline sur le couplage protéique PGC-1 α /PPAR β reste à approfondir. Effectivement, nous démontrons que l'interaction est diminuée en réponse à la ghréline dans un contexte agoniste-indépendant dans les cellules HEK293. Cependant, la coactivation de PPAR β par PGC-1 α n'est diminuée par la ghréline dans les cellules HepG2 qu'en présence de l'agoniste de PPAR β . Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à ces résultats.

Tout d'abord, la présence de l'agoniste semble déterminante. La coopération entre PGC-1 α et PPAR β n'est pas encore bien comprise. Néanmoins, nous savons qu'elle est dépendante du contexte promoteur et que selon les études, elle s'avère agoniste-dépendante ou indépendante (Dressel et al. 2003, Wang et al. 2003, Kleiner et al. 2009). L'implication de PGC-1 α auprès de PPAR β semble dépendant de la présence du ligand. Par exemple, l'induction de l'expression du gène *Pkd4*, une cible reconnue de PPAR, est dépendante de la présence de PGC-1 α uniquement en absence de l'agoniste de PPAR β (Kleiner et al.

2009). PPAR β seul induit l'expression seulement en présence de l'agoniste. Il serait donc intéressant d'effectuer des tests d'activité transcriptionnelle spécifique avec différents promoteurs de gènes cibles de PPAR β .

De plus, nous savons que PGC-1 α est inactif et relocalisé dans des foci nucléaires lorsqu'il est acétylé (Lerin et al. 2006). Nous savons également que ceci engendre une capacité de coactivation et une régulation de l'expression génique réduite, avec un éloignement de PGC-1 α de ses promoteurs cibles. Néanmoins, aucunes données dans la littérature ne démontrent jusqu'à présent et de façon claire la relation entre l'acétylation de PGC-1 α et la liaison avec ses partenaires. Selon certains modèles, PGC-1 α peut rester lié à ses partenaires lorsqu'il est acétylé et relocalisé dans les foci nucléaires (Dominy et al. 2010). A l'inverse, d'autres modèles proposent que lorsque PGC-1 α est acétylé, il devient incapable de lier ses partenaires (Jeninga et al. 2010). Dans le cadre de notre étude, Il serait nécessaire d'effectuer des expériences de co-immunoprécipitation et des tests de coactivation (gène rapporteur) en surexprimant la désacétylase Sirt1 ou l'acétyl-transferase GCN5. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques tels que Ex527 (inhibiteur de Sirt1) permettrait également de conforter ces expériences.

Il est à noter que, l'étude de l'interaction entre PGC-1 α et PPAR β et la capacité de coactivation de PGC-1 α ont été réalisés dans deux contextes cellulaires différents. Les cellules HEK293 sont utilisées dans un contexte hétérologue où GHS-R1a est surexprimé de façon transitoire. Les cellules HepG2 sont utilisées dans un contexte d'expression endogène du récepteur. La quantité du plasmide codant pour GHS-R1a utilisée pour les transfections des cellules HEK293 peut induire une variation dans la signalisation du récepteur. Dans nos expériences, elle a été déterminée de façon à avoir le minimum de conséquences sur la machinerie totale de transcription et l'intégrité des cellules. Une partie

des études effectuées sur l'activité de GHS-R1a sont réalisées dans des cellules transfectées de façon stable. Dans d'autres études, où les cellules HEK293 sont transfectées transitoirement avec GHS-R1a, les auteurs utilisent des quantités bien supérieures aux nôtres. Un test d'activité du GHS-R1a dans nos cellules transfectées pourrait nous aider à déterminer la quantité d'ADN adaptée à nos protocoles de transfection. Pour cela, il serait possible de réaliser des tests d'activité en gène rapporteur à la luciférase fusionné avec l'élément de réponse reconnu par un effecteur activé dans la voie de signalisation à laquelle on s'intéresse (Fan et al. 2005). Pour GHS-R1a, nous avons vu que ces voies peuvent impliquer une augmentation de calcium intracellulaire ou une activation de MAPKs. L'utilisation d'un peptide synthétique tel que l'hexaréline pourrait également être réalisée pour étudier le rôle de GHS-R1a dans la réponse à la ghréline des cellules HEK293 (Avallone et al. 2006).

En ce qui concerne les niveaux d'expression de GHS-R1a dans les cellules HepG2, les données de la littérature divergent. Certaines études démontrent l'expression de GHS-R1a dans le foie et la lignée cellulaire d'hépatome HepG2 (Murata et al. 2002). Alors que d'autres n'ont pas détecté GHS-R1a ni dans le foie (McGirr et al. 2011), ni dans des hépatocytes primaires (Gauna et al. 2005), ni dans les cellules HepG2 (Thielemans et al. 2007). Dans le cadre de nos expériences, nous avons détecté la présence de l'ARNm spécifique du GHS-R1a dans les cellules HepG2 par étude de PCR en temps réel (données non présentées). Néanmoins, il est primordial de confirmer son exposition à la surface des cellules par analyse en cytométrie de flux. De plus, une analyse en Western blot pourrait nous permettre de confirmer la présence protéique de GHS-R1a. L'implication de GHS-R1a dans la régulation de PGC-1 α au sein des cellules HepG2 peut être démontrée grâce à l'utilisation d'antagoniste (Substance P) ou d'agoniste inverse de GHS-R1a (GHRP6) et grâce à une approche de shARN contre GHS-R1a. Ces approches nous permettraient d'assurer le rôle spécifique de GHS-R1a dans la réponse des cellules à la ghréline.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Un déséquilibre de l'homéostasie énergétique est souvent associé aux maladies métaboliques. Par exemple, lorsque le surplus d'énergie est trop important, l'organisme n'arrive plus à s'adapter et le processus de régulation devient défaillant avec des conséquences néfastes sur le métabolisme. Il se développe alors le syndrome métabolique qui mène à des complications graves telles que l'obésité, le diabète de type II, les dyslipidémies et les maladies cardiovasculaires.

Dans cette étude, nous avons montré que l'activité constitutive du récepteur de la ghréline (GHS-R1a) engendre une inhibition de PGC-1 α caractérisée par une augmentation de l'acétylation. Il est possible de constater également une accumulation de PGC-1 α . Ces effets étant comparables à ceux de l'acétyltransférase GCN5 connue pour inhiber et acétyler PGC-1 α , nous avons émis l'hypothèse que l'effet de GHS-R1a sur PGC-1 α pourraient impliquer GCN5. Il est également possible que GHS-R1a diminue le ratio NAD/NADH qui d'une part inhiberait la désacétylase Sirt1 et d'autre part activerait l'oxydoréductase NQO1 (sensible au NADH) qui protégerait PGC-1 α d'une dégradation par défaut. Dans l'avenir, il sera très intéressant d'analyser l'activité de GCN5 et Sirt1 en réponse au GHS-R1a ainsi que l'interaction entre PGC-1 α et ces deux régulateurs.

Nous avons également constaté que la ghréline semble, à l'inverse de son récepteur, activer PGC-1 α . L'acétylation de PGC-1 α ne serait pas impliquée. Dans cette réponse, les effets divergents de la ghréline et de son récepteur semblent inattendus puisque la ghréline active GHS-R1a. Il se pourrait que la liaison du ligand induise une voie de signalisation spécifique et indépendante des voies activées par le récepteur seul, comme proposé dans la littérature. La caractérisation des effecteurs impliqués dans l'effet de la ghréline et de son récepteur permettrait d'expliquer ces effets.

Enfin, nous avons observé que la ghréline diminue l'interaction entre PGC-1 α et son partenaire PPAR β de façon ligand-indépendante. Dans les cellules HepG2, l'effet inhibiteur de la ghréline sur la capacité de PGC-1 α à coactiver son partenaire a été

démontré de façon ligand-dépendante. Nous avons proposé que l'activation de PGC-1 α en réponse à la ghréline pourrait bénéficier à un autre partenaire de PGC-1 α , autre que PPAR β . La présence de l'agoniste de PPAR β pourrait être impliquée dans le rôle coactivateur de PGC-1 α dans les cellules HepG2.

En perspective, il serait très intéressant d'approfondir l'effet du GHS-R1a sur PGC-1 α en identifiant les effecteurs des voies de signalisation impliquées. De plus, l'étude de la ghréline sur l'activité et la régulation de PGC-1 α dans les cellules HepG2 semble très prometteuse. Le contexte dépendant du partenaire et du promoteur cible devrait évidemment être pris en compte. Une attention particulière devrait être portée sur les facteurs de transcription et les promoteurs des gènes impliqués dans la régulation de la gluconéogenèse caractéristique au foie. De nombreuses évidences démontrent que la ghréline et PGC-1 α sont impliqués dans la régulation des mêmes voies métaboliques dont la gluconéogenèse hépatique. Les effecteurs impliqués dans la signalisation de la ghréline sont souvent associés à la régulation post-traductionnelle de PGC-1 α . Les plus connus étant des kinases et phosphorylases, une étude poussée sur la phosphorylation de PGC-1 α et les effecteurs impliqués serait nécessaire.

La ghréline et PGC-1 α , deux facteurs importants de ce processus, sont impliqués dans le syndrome métabolique. L'identification et la caractérisation de nouvelles cascades de signalisation effectuées au laboratoire s'avère très prometteur (Rodrigue-Way et al. 2007, Rodrigue-Way et al. 2013). Effectivement, une meilleure compréhension de la régulation de l'équilibre énergétique nous permettra de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques aux maladies métaboliques (Demers et al. 2008). Dans les années 2007-2009, le Canada comptait près de 19 % d'adultes touchés par ce syndrome (Riediger et al. 2011). Compte tenu de la gravité des maladies chroniques engendrées par ce déséquilibre et l'accroissement incessant de leur prévalence à travers le globe, le syndrome métabolique est un enjeu mondial de santé publique considérable.

BIBLIOGRAPHIE

Adamovich, Y., A. Shlomai, P. Tsvetkov, K. B. Umansky, N. Reuven, J. L. Estall, B. M. Spiegelman and Y. Shaul (2013). "The protein level of PGC-1alpha, a key metabolic regulator, is controlled by NADH-NQO1." Mol Cell Biol **33**(13): 2603-2613.

Adams, E. F., B. Petersen, T. Lei, M. Buchfelder and R. Fahlbusch (1995). "The growth hormone secretagogue, L-692,429, induces phosphatidylinositol hydrolysis and hormone secretion by human pituitary tumors." Biochem Biophys Res Commun **208**(2): 555-561.

Akimoto, T., S. C. Pohnert, P. Li, M. Zhang, C. Gumbs, P. B. Rosenberg, R. S. Williams and Z. Yan (2005). "Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway." J Biol Chem **280**(20): 19587-19593.

Alen, F., I. Crespo, M. T. Ramirez-Lopez, N. Jagerovic, P. Goya, F. R. de Fonseca, R. G. de Heras and L. Orío (2013). "Ghrelin-induced orexigenic effect in rats depends on the metabolic status and is counteracted by peripheral CB1 receptor antagonism." PLoS One **8**(4): e60918.

Arvat, E., M. Maccario, L. Di Vito, F. Broglio, A. Benso, C. Gottero, M. Papotti, G. Muccioli, C. Dieguez, F. F. Casanueva, R. Deghenghi, F. Camanni and E. Ghigo (2001). "Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone." J Clin Endocrinol Metab **86**(3): 1169-1174.

Avallone, R., A. Demers, A. Rodrigue-Way, K. Bujold, D. Harb, S. Anghel, W. Wahli, S. Marleau, H. Ong and A. Tremblay (2006). "A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor up-regulates sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway." Mol Endocrinol **20**(12): 3165-3178.

Baar, K., A. R. Wende, T. E. Jones, M. Marison, L. A. Nolte, M. Chen, D. P. Kelly and J. O. Holloszy (2002). "Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1." FASEB J **16**(14): 1879-1886.

Barazzoni, R., A. Bosutti, M. Stebel, M. R. Cattin, E. Roder, L. Visintin, L. Cattin, G. Biolo, M. Zanetti and G. Guarnieri (2005). "Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **288**(1): E228-235.

Barazzoni, R., M. Zanetti, M. R. Cattin, L. Visintin, P. Vinci, L. Cattin, M. Stebel and G. Guarnieri (2007). "Ghrelin enhances in vivo skeletal muscle but not liver AKT signaling in rats." Obesity (Silver Spring) **15**(11): 2614-2623.

- Bernard, C. (1966). Introduction à l'étude de la médecine expérimentale (1865).
- Bojic, L. A. and M. W. Huff (2013). "Peroxisome proliferator-activated receptor delta: a multifaceted metabolic player." Curr Opin Lipidol **24**(2): 171-177.
- Bojic, L. A., C. G. Sawyez, D. E. Telford, J. Y. Edwards, R. A. Hegele and M. W. Huff (2012). "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta inhibits human macrophage foam cell formation and the inflammatory response induced by very low-density lipoprotein." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(12): 2919-2928.
- Boss, O., E. Bachman, A. Vidal-Puig, C. Y. Zhang, O. Peroni and B. B. Lowell (1999). "Role of the beta(3)-adrenergic receptor and/or a putative beta(4)-adrenergic receptor on the expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1." Biochem Biophys Res Commun **261**(3): 870-876.
- Bowers, C. Y., F. Momany, G. A. Reynolds, D. Chang, A. Hong and K. Chang (1980). "Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro." Endocrinology **106**(3): 663-667.
- Broglio, F., C. Gottero, F. Prodam, C. Gauna, G. Muccioli, M. Papotti, T. Aribat, A. J. Van Der Lely and E. Ghigo (2004). "Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans." J Clin Endocrinol Metab **89**(6): 3062-3065.
- Camina, J. P., M. C. Carreira, S. El Messari, C. Llorens-Cortes, R. G. Smith and F. F. Casanueva (2004). "Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a." Endocrinology **145**(2): 930-940.
- Camina, J. P., M. Lodeiro, O. Ischenko, A. C. Martini and F. F. Casanueva (2007). "Stimulation by ghrelin of p42/p44 mitogen-activated protein kinase through the GHS-R1a receptor: role of G-proteins and beta-arrestins." J Cell Physiol **213**(1): 187-200.
- Canto, C., Z. Gerhart-Hines, J. N. Feige, M. Lagouge, L. Noriega, J. C. Milne, P. J. Elliott, P. Puigserver and J. Auwerx (2009). "AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity." Nature **458**(7241): 1056-1060.
- Cao, W., K. W. Daniel, J. Robidoux, P. Puigserver, A. V. Medvedev, X. Bai, L. M. Floering, B. M. Spiegelman and S. Collins (2004). "p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene." Mol Cell Biol **24**(7): 3057-3067.
- Chen, C., D. Wu and I. J. Clarke (1996). "Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs." J Endocrinol **148**(3): 381-386.

Choi, K., S. G. Roh, Y. H. Hong, Y. B. Shrestha, D. Hishikawa, C. Chen, M. Kojima, K. Kangawa and S. Sasaki (2003). "The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis." Endocrinology **144**(3): 754-759.

Chow, K. B., J. Sun, K. M. Chu, W. Tai Cheung, C. H. Cheng and H. Wise (2012). "The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression." Mol Cell Endocrinol **348**(1): 247-254.

Chu, K. M., K. B. Chow, P. K. Leung, P. N. Lau, C. B. Chan, C. H. Cheng and H. Wise (2007). "Over-expression of the truncated ghrelin receptor polypeptide attenuates the constitutive activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C by ghrelin receptors but has no effect on ghrelin-stimulated extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity." Int J Biochem Cell Biol **39**(4): 752-764.

Chung, H., S. Seo, M. Moon and S. Park (2008). "Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 beta and ERK1/2 pathways mediate protective effects of acylated and unacylated ghrelin against oxygen-glucose deprivation-induced apoptosis in primary rat cortical neuronal cells." J Endocrinol **198**(3): 511-521.

Collins, Q. F., Y. Xiong, E. G. Lupo, Jr., H. Y. Liu and W. Cao (2006). "p38 Mitogen-activated protein kinase mediates free fatty acid-induced gluconeogenesis in hepatocytes." J Biol Chem **281**(34): 24336-24344.

Colombo, M., S. Gregersen, J. Xiao and K. Hermansen (2003). "Effects of ghrelin and other neuropeptides (CART, MCH, orexin A and B, and GLP-1) on the release of insulin from isolated rat islets." Pancreas **27**(2): 161-166.

Costa, T. and S. Cotecchia (2005). "Historical review: Negative efficacy and the constitutive activity of G-protein-coupled receptors." Trends Pharmacol Sci **26**(12): 618-624.

Coste, A., J. F. Louet, M. Lagouge, C. Lerin, M. C. Antal, H. Meziane, K. Schoonjans, P. Puigserver, B. W. O'Malley and J. Auwerx (2008). "The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1 α ." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(44): 17187-17192.

Cowley, M. A., R. G. Smith, S. Diano, M. Tschop, N. Pronchuk, K. L. Grove, C. J. Strasburger, M. Bidlingmaier, M. Esterman, M. L. Heiman, L. M. Garcia-Segura, E. A. Nillni, P. Mendez, M. J. Low, P. Sotonyi, J. M. Friedman, H. Liu, S. Pinto, W. F. Colmers, R. D. Cone and T. L. Horvath (2003). "The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis." Neuron **37**(4): 649-661.

- Cummings, D. E., J. Q. Purnell, R. S. Frayo, K. Schmidova, B. E. Wisse and D. S. Weigle (2001). "A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans." Diabetes **50**(8): 1714-1719.
- Damian, M., J. Marie, J. P. Leyris, J. A. Fehrentz, P. Verdie, J. Martinez, J. L. Baneres and S. Mary (2012). "High constitutive activity is an intrinsic feature of ghrelin receptor protein: a study with a functional monomeric GHS-R1a receptor reconstituted in lipid discs." J Biol Chem **287**(6): 3630-3641.
- Demers, A., V. Caron, A. Rodrigue-Way, W. Wahli, H. Ong and A. Tremblay (2009). "A concerted kinase interplay identifies PPARgamma as a molecular target of ghrelin signaling in macrophages." PLoS One **4**(11): e7728.
- Demers, A., A. Rodrigue-Way and A. Tremblay (2008). "Hexarelin Signaling to PPARgamma in Metabolic Diseases." PPAR Res **2008**: 364784.
- Dezaki, K., H. Hosoda, M. Kakei, S. Hashiguchi, M. Watanabe, K. Kangawa and T. Yada (2004). "Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺ signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents." Diabetes **53**(12): 3142-3151.
- Dezaki, K., M. Kakei and T. Yada (2007). "Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin." Diabetes **56**(9): 2319-2327.
- Dixit, V. D., E. M. Schaffer, R. S. Pyle, G. D. Collins, S. K. Sakthivel, R. Palaniappan, J. W. Lillard, Jr. and D. D. Taub (2004). "Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells." J Clin Invest **114**(1): 57-66.
- Dominy, J. E., Jr., Y. Lee, Z. Gerhart-Hines and P. Puigserver (2010). "Nutrient-dependent regulation of PGC-1alpha's acetylation state and metabolic function through the enzymatic activities of Sirt1/GCN5." Biochim Biophys Acta **1804**(8): 1676-1683.
- Dressel, U., T. L. Allen, J. B. Pippal, P. R. Rohde, P. Lau and G. E. Muscat (2003). "The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells." Mol Endocrinol **17**(12): 2477-2493.
- Fan, F., A. Paguio, D. Garvin and K. Wood (2005). "Using luciferase assays to study G-protein-coupled receptor pathways and screen for GPCR modulators." Cell notes **13**: 5-7.
- Fan, M., J. Rhee, J. St-Pierre, C. Handschin, P. Puigserver, J. Lin, S. Jaeger, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and B. M. Spiegelman (2004). "Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK." Genes Dev **18**(3): 278-289.

- Feighner, S. D., C. P. Tan, K. K. McKee, O. C. Palyha, D. L. Hreniuk, S. S. Pong, C. P. Austin, D. Figueroa, D. MacNeil, M. A. Cascieri, R. Nargund, R. Bakshi, M. Abramovitz, R. Stocco, S. Kargman, G. O'Neill, L. H. Van Der Ploeg, J. Evans, A. A. Patchett, R. G. Smith and A. D. Howard (1999). "Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system." Science **284**(5423): 2184-2188.
- Fernandez-Marcos, P. J. and J. Auwerx (2011). "Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis." Am J Clin Nutr **93**(4): 884S-890.
- Finck, B. N. and D. P. Kelly (2006). "PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease." J Clin Invest **116**(3): 615-622.
- Finck, B. N. and D. P. Kelly (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease." Circulation **115**(19): 2540-2548.
- Forman, B. M., J. Chen and R. M. Evans (1997). "Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4312-4317.
- Fulco, M. and V. Sartorelli (2008). "Comparing and contrasting the roles of AMPK and SIRT1 in metabolic tissues." Cell Cycle **7**(23): 3669-3679.
- Furuta, M., T. Funabashi and F. Kimura (2001). "Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats." Biochem Biophys Res Commun **288**(4): 780-785.
- Gauna, C., P. J. Delhanty, L. J. Hofland, J. A. Janssen, F. Broglio, R. J. Ross, E. Ghigo and A. J. van der Lely (2005). "Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes." J Clin Endocrinol Metab **90**(2): 1055-1060.
- Gil-Campos, M., C. M. Aguilera, R. Canete and A. Gil (2006). "Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis." Br J Nutr **96**(2): 201-226.
- Gnanapavan, S., B. Kola, S. A. Bustin, D. G. Morris, P. McGee, P. Fairclough, S. Bhattacharya, R. Carpenter, A. B. Grossman and M. Korbonits (2002). "The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans." J Clin Endocrinol Metab **87**(6): 2988.
- Gomez-Ambrosi, J., G. Fruhbeck and J. A. Martinez (2001). "Rapid in vivo PGC-1 mRNA upregulation in brown adipose tissue of Wistar rats by a beta(3)-adrenergic agonist and lack of effect of leptin." Mol Cell Endocrinol **176**(1-2): 85-90.
- Goto, M., S. Terada, M. Kato, M. Katoh, T. Yokozeki, I. Tabata and T. Shimokawa (2000). "cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats." Biochem Biophys Res Commun **274**(2): 350-354.

Granata, R., F. Settanni, L. Biancone, L. Trovato, R. Nano, F. Bertuzzi, S. Destefanis, M. Annunziata, M. Martinetti, F. Catapano, C. Ghe, J. Isgaard, M. Papotti, E. Ghigo and G. Muccioli (2007). "Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets: involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling." Endocrinology **148**(2): 512-529.

Guan, X. M., H. Yu, O. C. Palyha, K. K. McKee, S. D. Feighner, D. J. Sirinathsinghji, R. G. Smith, L. H. Van der Ploeg and A. D. Howard (1997). "Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues." Brain Res Mol Brain Res **48**(1): 23-29.

Handschin, C., J. Rhee, J. Lin, P. T. Tarr and B. M. Spiegelman (2003). "An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7111-7116.

Hataya, Y., T. Akamizu, K. Takaya, N. Kanamoto, H. Ariyasu, M. Saijo, K. Moriyama, A. Shimatsu, M. Kojima, K. Kangawa and K. Nakao (2001). "A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans." J Clin Endocrinol Metab **86**(9): 4552.

Hattori, N., T. Saito, T. Yagyu, B. H. Jiang, K. Kitagawa and C. Inagaki (2001). "GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils." J Clin Endocrinol Metab **86**(9): 4284-4291.

Herrington, J. and B. Hille (1994). "Growth hormone-releasing hexapeptide elevates intracellular calcium in rat somatotropes by two mechanisms." Endocrinology **135**(3): 1100-1108.

Herzig, S., F. Long, U. S. Jhala, S. Hedrick, R. Quinn, A. Bauer, D. Rudolph, G. Schutz, C. Yoon, P. Puigserver, B. Spiegelman and M. Montminy (2001). "CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1." Nature **413**(6852): 179-183.

Holliday, N. D., B. Holst, E. A. Rodionova, T. W. Schwartz and H. M. Cox (2007). "Importance of constitutive activity and arrestin-independent mechanisms for intracellular trafficking of the ghrelin receptor." Mol Endocrinol **21**(12): 3100-3112.

Holst, B., A. Cygankiewicz, T. H. Jensen, M. Ankersen and T. W. Schwartz (2003). "High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist." Mol Endocrinol **17**(11): 2201-2210.

Holst, B., T. M. Frimurer, J. Mokrosinski, T. Halkjaer, K. B. Cullberg, C. R. Underwood and T. W. Schwartz (2009). "Overlapping binding site for the endogenous agonist, small-molecule agonists, and ago-allosteric modulators on the ghrelin receptor." Mol Pharmacol **75**(1): 44-59.

- Holst, B., N. D. Holliday, A. Bach, C. E. Elling, H. M. Cox and T. W. Schwartz (2004). "Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family." J Biol Chem **279**(51): 53806-53817.
- Houtkooper, R. H., C. Canto, R. J. Wanders and J. Auwerx (2010). "The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways." Endocr Rev **31**(2): 194-223.
- Howard, A. D., S. D. Feighner, D. F. Cully, J. P. Arena, P. A. Liberators, C. I. Rosenblum, M. Hamelin, D. L. Hreniuk, O. C. Palyha, J. Anderson, P. S. Paress, C. Diaz, M. Chou, K. K. Liu, K. K. McKee, S. S. Pong, L. Y. Chaung, A. Elbrecht, M. Dashkevich, R. Heavens, M. Rigby, D. J. Sirinathsinghji, D. C. Dean, D. G. Melillo, A. A. Patchett, R. Nargund, P. R. Griffin, J. A. DeMartino, S. K. Gupta, J. M. Schaeffer, R. G. Smith and L. H. Van der Ploeg (1996). "A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release." Science **273**(5277): 974-977.
- Issemann, I. and S. Green (1990). "Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators." Nature **347**(6294): 645-650.
- Jager, S., C. Handschin, J. St-Pierre and B. M. Spiegelman (2007). "AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α ." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(29): 12017-12022.
- Jeninga, E. H., K. Schoonjans and J. Auwerx (2010). "Reversible acetylation of PGC-1: connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility." Oncogene **29**(33): 4617-4624.
- Khorasanizadeh, S. and F. Rastinejad (2001). "Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements." Trends Biochem Sci **26**(6): 384-390.
- Kirchner, H., J. A. Gutierrez, P. J. Solenberg, P. T. Pfluger, T. A. Czyzyk, J. A. Willency, A. Schurmann, H. G. Joost, R. J. Jandacek, J. E. Hale, M. L. Heiman and M. H. Tschoop (2009). "GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance." Nat Med **15**(7): 741-745.
- Kleiner, S., R. J. Mepani, D. Laznik, L. Ye, M. J. Jurczak, F. R. Jornayvaz, J. L. Estall, D. Chatterjee Bhowmick, G. I. Shulman and B. M. Spiegelman (2012). "Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1 α in adipose tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(24): 9635-9640.
- Kleiner, S., V. Nguyen-Tran, O. Bare, X. Huang, B. Spiegelman and Z. Wu (2009). "PPAR δ agonism activates fatty acid oxidation via PGC-1 α but does not increase mitochondrial gene expression and function." J Biol Chem **284**(28): 18624-18633.
- Kojima, M. (2008). "The discovery of ghrelin--a personal memory." Regul Pept **145**(1-3): 2-6.

- Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo and K. Kangawa (1999). "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." Nature **402**(6762): 656-660.
- Kola, B., I. Farkas, M. Christ-Crain, G. Wittmann, F. Lolli, F. Amin, J. Harvey-White, Z. Liposits, G. Kunos, A. B. Grossman, C. Fekete and M. Korbónits (2008). "The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system." PLoS One **3**(3): e1797.
- Lagouge, M., C. Argmann, Z. Gerhart-Hines, H. Meziane, C. Lerin, F. Daussin, N. Messadeq, J. Milne, P. Lambert, P. Elliott, B. Geny, M. Laakso, P. Puigserver and J. Auwerx (2006). "Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha." Cell **127**(6): 1109-1122.
- Lai, L., T. C. Leone, C. Zechner, P. J. Schaeffer, S. M. Kelly, D. P. Flanagan, D. M. Medeiros, A. Kovacs and D. P. Kelly (2008). "Transcriptional coactivators PGC-1alpha and PGC-1beta control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart." Genes Dev **22**(14): 1948-1961.
- Laudet, V., C. Hanni, J. Coll, F. Catzeflis and D. Stehelin (1992). "Evolution of the nuclear receptor gene superfamily." EMBO J **11**(3): 1003-1013.
- Lee, C. H., K. Kang, I. R. Mehl, R. Nofsinger, W. A. Alaynick, L. W. Chong, J. M. Rosenfeld and R. M. Evans (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes very low-density lipoprotein-derived fatty acid catabolism in the macrophage." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(7): 2434-2439.
- Lehman, J. J., P. M. Barger, A. Kovacs, J. E. Saffitz, D. M. Medeiros and D. P. Kelly (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis." J Clin Invest **106**(7): 847-856.
- Lei, T., M. Buchfelder, R. Fahlbusch and E. F. Adams (1995). "Growth hormone releasing peptide (GHRP-6) stimulates phosphatidylinositol (PI) turnover in human pituitary somatotroph cells." J Mol Endocrinol **14**(1): 135-138.
- Leone, T. C., J. J. Lehman, B. N. Finck, P. J. Schaeffer, A. R. Wende, S. Boudina, M. Courtois, D. F. Wozniak, N. Sambandam, C. Bernal-Mizrachi, Z. Chen, J. O. Holloszy, D. M. Medeiros, R. E. Schmidt, J. E. Saffitz, E. D. Abel, C. F. Semenkovich and D. P. Kelly (2005). "PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis." PLoS Biol **3**(4): e101.
- Lerin, C., J. T. Rodgers, D. E. Kalume, S. H. Kim, A. Pandey and P. Puigserver (2006). "GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1alpha." Cell Metab **3**(6): 429-438.

- Li, X., B. Monks, Q. Ge and M. J. Birnbaum (2007). "Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator." Nature **447**(7147): 1012-1016.
- Li, Y., W. Xu, M. W. McBurney and V. D. Longo (2008). "SirT1 inhibition reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons." Cell Metab **8**(1): 38-48.
- Liang, H. and W. F. Ward (2006). "PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism." Adv Physiol Educ **30**(4): 145-151.
- Lim, C. T., B. Kola, D. Feltrin, D. Perez-Tilve, M. H. Tschop, A. B. Grossman and M. Korbonits (2013). "Ghrelin and cannabinoids require the ghrelin receptor to affect cellular energy metabolism." Mol Cell Endocrinol **365**(2): 303-308.
- Lim, C. T., B. Kola and M. Korbonits (2011). "The ghrelin/GOAT/GHS-R system and energy metabolism." Rev Endocr Metab Disord **12**(3): 173-186.
- Lin, J., H. Wu, P. T. Tarr, C. Y. Zhang, Z. Wu, O. Boss, L. F. Michael, P. Puigserver, E. Isotani, E. N. Olson, B. B. Lowell, R. Bassel-Duby and B. M. Spiegelman (2002). "Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres." Nature **418**(6899): 797-801.
- Lin, J., P. H. Wu, P. T. Tarr, K. S. Lindenberg, J. St-Pierre, C. Y. Zhang, V. K. Mootha, S. Jager, C. R. Vianna, R. M. Reznick, L. Cui, M. Manieri, M. X. Donovan, Z. Wu, M. P. Cooper, M. C. Fan, L. M. Rohas, A. M. Zavacki, S. Cinti, G. I. Shulman, B. B. Lowell, D. Krainc and B. M. Spiegelman (2004). "Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice." Cell **119**(1): 121-135.
- Liu, S., B. Hatano, M. Zhao, C. C. Yen, K. Kang, S. M. Reilly, M. R. Gangl, C. Gorgun, J. A. Balschi, J. M. Ntambi and C. H. Lee (2011). "Role of peroxisome proliferator-activated receptor δ / β in hepatic metabolic regulation." J Biol Chem **286**(2): 1237-1247.
- Lodeiro, M., M. Theodoropoulou, M. Pardo, F. F. Casanueva and J. P. Camina (2009). "c-Src regulates Akt signaling in response to ghrelin via beta-arrestin signaling-independent and -dependent mechanisms." PLoS One **4**(3): e4686.
- Louet, J. F., G. Hayhurst, F. J. Gonzalez, J. Girard and J. F. Decaux (2002). "The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB)." J Biol Chem **277**(41): 37991-38000.
- Lustig, Y., J. L. Ruas, J. L. Estall, J. C. Lo, S. Devarakonda, D. Laznik, J. H. Choi, H. Ono, J. V. Olsen and B. M. Spiegelman (2011). "Separation of the gluconeogenic and mitochondrial functions of PGC-1{alpha} through S6 kinase." Genes Dev **25**(12): 1232-1244.

- Mary, S., M. Damian, M. Louet, N. Floquet, J. A. Fehrentz, J. Marie, J. Martinez and J. L. Baneres (2012). "Ligands and signaling proteins govern the conformational landscape explored by a G protein-coupled receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(21): 8304-8309.
- Matsusue, K., A. Miyoshi, S. Yamano and F. J. Gonzalez (2006). "Ligand-activated PPARbeta efficiently represses the induction of LXR-dependent promoter activity through competition with RXR." Mol Cell Endocrinol **256**(1-2): 23-33.
- Mazzocchi, G., G. Neri, M. Rucinski, P. Rebuffat, R. Spinazzi, L. K. Malendowicz and G. G. Nussdorfer (2004). "Ghrelin enhances the growth of cultured human adrenal zona glomerulosa cells by exerting MAPK-mediated proliferogenic and antiapoptotic effects." Peptides **25**(8): 1269-1277.
- McGirr, R., M. S. McFarland, J. McTavish, L. G. Luyt and S. Dhanvantari (2011). "Design and characterization of a fluorescent ghrelin analog for imaging the growth hormone secretagogue receptor 1a." Regul Pept **172**(1-3): 69-76.
- Michael, L. F., Z. Wu, R. B. Cheatham, P. Puigserver, G. Adelmant, J. J. Lehman, D. P. Kelly and B. M. Spiegelman (2001). "Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 3820-3825.
- Moore, L. B., J. M. Maglich, D. D. McKee, B. Wisely, T. M. Willson, S. A. Kliewer, M. H. Lambert and J. T. Moore (2002). "Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors." Mol Endocrinol **16**(5): 977-986.
- Murata, M., Y. Okimura, K. Iida, M. Matsumoto, H. Sowa, H. Kaji, M. Kojima, K. Kangawa and K. Chihara (2002). "Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells." J Biol Chem **277**(7): 5667-5674.
- Nagy, L. and J. W. Schwabe (2004). "Mechanism of the nuclear receptor molecular switch." Trends Biochem Sci **29**(6): 317-324.
- Narkar, V. A., M. Downes, R. T. Yu, E. Embler, Y. X. Wang, E. Banayo, M. M. Mihaylova, M. C. Nelson, Y. Zou, H. Juguilon, H. Kang, R. J. Shaw and R. M. Evans (2008). "AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics." Cell **134**(3): 405-415.
- Nemoto, S., M. M. Fergusson and T. Finkel (2005). "SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 {alpha}." J Biol Chem **280**(16): 16456-16460.
- Noriega, L. G., J. N. Feige, C. Canto, H. Yamamoto, J. Yu, M. A. Herman, C. Matak, B. B. Kahn and J. Auwerx (2011). "CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability." EMBO Rep **12**(10): 1069-1076.

- Norrbom, J., C. J. Sundberg, H. Ameln, W. E. Kraus, E. Jansson and T. Gustafsson (2004). "PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle." J Appl Physiol (1985) **96**(1): 189-194.
- Olesen, J., K. Kiilerich and H. Pilegaard (2010). "PGC-1alpha-mediated adaptations in skeletal muscle." Pflugers Arch **460**(1): 153-162.
- Olson, B. L., M. B. Hock, S. Ekholm-Reed, J. A. Wohlschlegel, K. K. Dev, A. Kralli and S. I. Reed (2008). "SCFCdc4 acts antagonistically to the PGC-1alpha transcriptional coactivator by targeting it for ubiquitin-mediated proteolysis." Genes Dev **22**(2): 252-264.
- Pantel, J., M. Legendre, S. Cabrol, L. Hilal, Y. Hajaji, S. Morisset, S. Nivot, M. P. Vie-Luton, D. Grouselle, M. de Kerdanet, A. Kadiri, J. Epelbaum, Y. Le Bouc and S. Amselem (2006). "Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature." J Clin Invest **116**(3): 760-768.
- Passmore, L. A. and D. Barford (2004). "Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation." Biochem J **379**(Pt 3): 513-525.
- Patterson, M., K. G. Murphy, C. W. le Roux, M. A. Ghatei and S. R. Bloom (2005). "Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma." J Clin Endocrinol Metab **90**(4): 2205-2211.
- Perissi, V. and M. G. Rosenfeld (2005). "Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(7): 542-554.
- Petersen, P. S., D. P. Woldbye, A. N. Madsen, K. L. Egerod, C. Jin, M. Lang, M. Rasmussen, A. G. Beck-Sickinger and B. Holst (2009). "In vivo characterization of high Basal signaling from the ghrelin receptor." Endocrinology **150**(11): 4920-4930.
- Pfluger, P. T., H. Kirchner, S. Gunnel, B. Schrott, D. Perez-Tilve, S. Fu, S. C. Benoit, T. Horvath, H. G. Joost, K. E. Wortley, M. W. Sleeman and M. H. Tschoop (2008). "Simultaneous deletion of ghrelin and its receptor increases motor activity and energy expenditure." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **294**(3): G610-618.
- Puigserver, P., G. Adelmant, Z. Wu, M. Fan, J. Xu, B. O'Malley and B. M. Spiegelman (1999). "Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking." Science **286**(5443): 1368-1371.
- Puigserver, P., J. Rhee, J. Lin, Z. Wu, J. C. Yoon, C. Y. Zhang, S. Krauss, V. K. Mootha, B. B. Lowell and B. M. Spiegelman (2001). "Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1." Mol Cell **8**(5): 971-982.

- Puigserver, P., Z. Wu, C. W. Park, R. Graves, M. Wright and B. M. Spiegelman (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." Cell **92**(6): 829-839.
- Purnell, J. Q., D. S. Weigle, P. Breen and D. E. Cummings (2003). "Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans." J Clin Endocrinol Metab **88**(12): 5747-5752.
- Reimer, M. K., G. Pacini and B. Ahren (2003). "Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse." Endocrinology **144**(3): 916-921.
- Revollo, J. R., A. A. Grimm and S. Imai (2004). "The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells." J Biol Chem **279**(49): 50754-50763.
- Revollo, J. R. and X. Li (2013). "The ways and means that fine tune Sirt1 activity." Trends Biochem Sci **38**(3): 160-167.
- Riediger, N. D. and I. Clara (2011). "Prevalence of metabolic syndrome in the Canadian adult population." CMAJ **183**(15): E1127-1134.
- Riediger, T., M. Traebert, H. A. Schmid, C. Scheel, T. A. Lutz and E. Scharrer (2003). "Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus." Neurosci Lett **341**(2): 151-155.
- Rigault, C., F. Le Borgne, B. Georges and J. Demarquoy (2007). "Ghrelin reduces hepatic mitochondrial fatty acid beta oxidation." J Endocrinol Invest **30**(4): RC4-8.
- Rodgers, J. T., C. Lerin, W. Haas, S. P. Gygi, B. M. Spiegelman and P. Puigserver (2005). "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1." Nature **434**(7029): 113-118.
- Rodgers, J. T. and P. Puigserver (2007). "Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(31): 12861-12866.
- Rodrigue-Way, A., V. Caron, S. Bilodeau, S. Keil, M. Hassan, E. Levy, G. A. Mitchell and A. Tremblay (2013). "Scavenger receptor CD36 mediates inhibition of cholesterol synthesis via activation of the PPARgamma/PGC-1alpha pathway and Insig1/2 expression in hepatocytes." FASEB J.
- Rodrigue-Way, A., A. Demers, H. Ong and A. Tremblay (2007). "A growth hormone-releasing peptide promotes mitochondrial biogenesis and a fat burning-like phenotype through scavenger receptor CD36 in white adipocytes." Endocrinology **148**(3): 1009-1018.

- Russell, A. P., J. Feilchenfeldt, S. Schreiber, M. Praz, A. Crettenand, C. Gobelet, C. A. Meier, D. R. Bell, A. Kralli, J. P. Giacobino and O. Deriaz (2003). "Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle." Diabetes **52**(12): 2874-2881.
- Rytinki, M. M. and J. J. Palvimo (2009). "SUMOylation attenuates the function of PGC-1alpha." J Biol Chem **284**(38): 26184-26193.
- Sakai, M., M. Matsumoto, T. Tujimura, C. Yongheng, T. Noguchi, K. Inagaki, H. Inoue, T. Hosooka, K. Takazawa, Y. Kido, K. Yasuda, R. Hiramatsu, Y. Matsuki and M. Kasuga (2012). "CITED2 links hormonal signaling to PGC-1alpha acetylation in the regulation of gluconeogenesis." Nat Med **18**(4): 612-617.
- Schaller, G., A. Schmidt, J. Pleiner, W. Woloszczuk, M. Wolzt and A. Luger (2003). "Plasma ghrelin concentrations are not regulated by glucose or insulin: a double-blind, placebo-controlled crossover clamp study." Diabetes **52**(1): 16-20.
- Schreiber, S. N., D. Knutti, K. Brogli, T. Uhlmann and A. Kralli (2003). "The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha)." J Biol Chem **278**(11): 9013-9018.
- Schwartz, T. W., T. M. Frimurer, B. Holst, M. M. Rosenkilde and C. E. Elling (2006). "Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model." Annu Rev Pharmacol Toxicol **46**: 481-519.
- Sears, I. B., M. A. MacGinnitie, L. G. Kovacs and R. A. Graves (1996). "Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma." Mol Cell Biol **16**(7): 3410-3419.
- Shaw, R. J., K. A. Lamia, D. Vasquez, S. H. Koo, N. Bardeesy, R. A. Depinho, M. Montminy and L. C. Cantley (2005). "The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin." Science **310**(5754): 1642-1646.
- Smith, R. G., L. H. Van der Ploeg, A. D. Howard, S. D. Feighner, K. Cheng, G. J. Hickey, M. J. Wyvrat, Jr., M. H. Fisher, R. P. Nargund and A. A. Patchett (1997). "Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion." Endocr Rev **18**(5): 621-645.
- Southgate, R. J., C. R. Bruce, A. L. Carey, G. R. Steinberg, K. Walder, R. Monks, M. J. Watt, J. A. Hawley, M. J. Birnbaum and M. A. Febbraio (2005). "PGC-1alpha gene expression is down-regulated by Akt-mediated phosphorylation and nuclear exclusion of FoxO1 in insulin-stimulated skeletal muscle." FASEB J **19**(14): 2072-2074.
- St-Pierre, J., S. Drori, M. Uldry, J. M. Silvaggi, J. Rhee, S. Jager, C. Handschin, K. Zheng, J. Lin, W. Yang, D. K. Simon, R. Bachoo and B. M. Spiegelman (2006). "Suppression of

reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators." Cell **127**(2): 397-408.

Sun, Y., S. Ahmed and R. G. Smith (2003). "Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite." Mol Cell Biol **23**(22): 7973-7981.

Suwa, M., H. Nakano and S. Kumagai (2003). "Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles." J Appl Physiol (1985) **95**(3): 960-968.

Takaya, K., H. Ariyasu, N. Kanamoto, H. Iwakura, A. Yoshimoto, M. Harada, K. Mori, Y. Komatsu, T. Usui, A. Shimatsu, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Kojima, K. Kangawa and K. Nakao (2000). "Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans." J Clin Endocrinol Metab **85**(12): 4908-4911.

Tanaka, T., J. Yamamoto, S. Iwasaki, H. Asaba, H. Hamura, Y. Ikeda, M. Watanabe, K. Magoori, R. X. Ioka, K. Tachibana, Y. Watanabe, Y. Uchiyama, K. Sumi, H. Iguchi, S. Ito, T. Doi, T. Hamakubo, M. Naito, J. Auwerx, M. Yanagisawa, T. Kodama and J. Sakai (2003). "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15924-15929.

Tannenbaum, G. S., J. Epelbaum and C. Y. Bowers (2003). "Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion." Endocrinology **144**(3): 967-974.

Thielemans, L., P. J. Peeters, H. Jonckheere, W. Luyten, R. de Hoogt, B. Coulie and J. Aerssens (2007). "The hepatocarcinoma cell line HepG2 does not express a GHS-R1a-type ghrelin receptor." J Recept Signal Transduct Res **27**(4): 309-322.

Tiraby, C. and D. Langin (2005). "PGC-1 α , un co-activateur transcriptionnel impliqué dans le métabolisme impliqué dans le métabolisme." Médecine sciences **21**(1): 49-54.

Tiraby, C., G. Tavernier, C. Lefort, D. Larrouy, F. Bouillaud, D. Ricquier and D. Langin (2003). "Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes." J Biol Chem **278**(35): 33370-33376.

Traebert, M., T. Riediger, S. Whitebread, E. Scharrer and H. A. Schmid (2002). "Ghrelin acts on leptin-responsive neurones in the rat arcuate nucleus." J Neuroendocrinol **14**(7): 580-586.

Tschop, M., D. L. Smiley and M. L. Heiman (2000). "Ghrelin induces adiposity in rodents." Nature **407**(6806): 908-913.

Um, S. H., D. D'Alessio and G. Thomas (2006). "Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1." Cell Metab **3**(6): 393-402.

- Vega, R. B., J. M. Huss and D. P. Kelly (2000). "The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes." Mol Cell Biol **20**(5): 1868-1876.
- Vestergaard, E. T., C. B. Djurhuus, J. Gjedsted, S. Nielsen, N. Moller, J. J. Holst, J. O. Jorgensen and O. Schmitz (2008). "Acute effects of ghrelin administration on glucose and lipid metabolism." J Clin Endocrinol Metab **93**(2): 438-444.
- Vosper, H., L. Patel, T. L. Graham, G. A. Khoudoli, A. Hill, C. H. Macphee, I. Pinto, S. A. Smith, K. E. Suckling, C. R. Wolf and C. N. Palmer (2001). "The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages." J Biol Chem **276**(47): 44258-44265.
- Wagner, K. D. and N. Wagner (2010). "Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions." Pharmacol Ther **125**(3): 423-435.
- Wagner, N., C. Jehl-Pietri, P. Lopez, J. Murdaca, C. Giordano, C. Schwartz, P. Gounon, S. N. Hatem, P. Grimaldi and K. D. Wagner (2009). "Peroxisome proliferator-activated receptor beta stimulation induces rapid cardiac growth and angiogenesis via direct activation of calcineurin." Cardiovasc Res **83**(1): 61-71.
- Wallberg, A. E., S. Yamamura, S. Malik, B. M. Spiegelman and R. G. Roeder (2003). "Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1alpha." Mol Cell **12**(5): 1137-1149.
- Wang, Y. X., C. H. Lee, S. Tjep, R. T. Yu, J. Ham, H. Kang and R. M. Evans (2003). "Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity." Cell **113**(2): 159-170.
- Wellen, K. E., G. Hatzivassiliou, U. M. Sachdeva, T. V. Bui, J. R. Cross and C. B. Thompson (2009). "ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation." Science **324**(5930): 1076-1080.
- Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla and B. M. Spiegelman (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." Cell **98**(1): 115-124.
- Yang, J., M. S. Brown, G. Liang, N. V. Grishin and J. L. Goldstein (2008). "Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone." Cell **132**(3): 387-396.
- Ylikomi, T., M. T. Bocquel, M. Berry, H. Gronemeyer and P. Chambon (1992). "Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors." EMBO J **11**(10): 3681-3694.

Yoon, J. C., P. Puigserver, G. Chen, J. Donovan, Z. Wu, J. Rhee, G. Adelmant, J. Stafford, C. R. Kahn, D. K. Granner, C. B. Newgard and B. M. Spiegelman (2001). "Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1." Nature **413**(6852): 131-138.

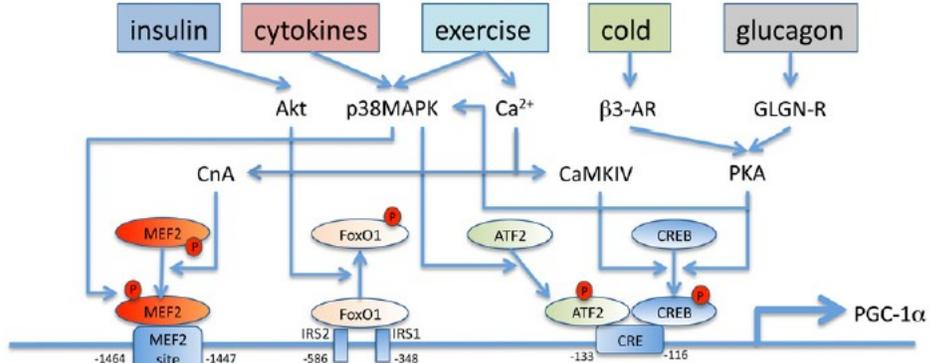
Zhang, Q., S. Y. Wang, C. Fleuriel, D. Leprince, J. V. Rocheleau, D. W. Piston and R. H. Goodman (2007). "Metabolic regulation of SIRT1 transcription via a HIC1:CtBP corepressor complex." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 829-833.

Zhao, T. J., G. Liang, R. L. Li, X. Xie, M. W. Sleeman, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, G. D. Yancopoulos, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2010). "Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(16): 7467-7472.

ANNEXES

Annexe 1. Régulation transcriptionnelle de PGC-1 α

Extrait de (Fernandez-Marcos et al. 2011).



Annexe 2. Réaction et enzymes impliquées dans la thermogénèse adaptative

Les enzymes et les fonctions démontrées comme induites par l'activation de PPAR β sont représentées en vert, celles inhibées en rouge. La flèche verte surligne l'absorption et l'oxydation des acides gras suivies du découplage de la phosphorylation oxydative. Extrait de (Dressel et al. 2003).

