

Université de Montréal

**Activation des voies de PI3 kinase/Akt et ERK1/2 par la
ghrelina et la des-acyl ghrelina dans les cellules
musculaires lisses vasculaires: voies potentielles de
signalisation dans la modulation de l'athérosclérose**

par

Sanny Moussette

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

Décembre 2005

© Sanny Moussette, 2005



QV

705
US8

200h
V 017

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Activation des voies de PI3 kinase/Akt et ERK1/2 par la ghreline et la des-acyl
ghreline dans les cellules musculaires lisses vasculaires : voies potentielles de
signalisation dans la modulation de l'athérosclérose

présenté par :
Sanny Moussette

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Daniel Lamontagne, président-rapporteur
Dr Huy Ong, directeur de recherche
Dr Marc Servant, co-directeur
Dr Martin Sirois, membre du jury

Résumé

La ghreline est le ligand endogène du GHS-R1a (growth hormone secretagogue receptor), lequel est largement exprimé dans l'organisme. De plus en plus d'évidences suggèrent que la ghreline et son récepteur joueraient un rôle dans le développement de l'athérosclérose. Cependant, le mécanisme d'action de la ghreline est encore inconnu. Au cours de cette pathologie, les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) vont proliférer de façon anormale. Plusieurs études ont montré un effet prolifératif de la ghreline sur différents types cellulaires via les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2. Nous pensons que la ghreline activerait la prolifération des CMLV via les voies de ERK1/2 et PI3 kinase/Akt au cours de l'athérosclérose. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons tout d'abord montré par RT-PCR que le *GHS-R1a* est exprimé dans les CMLV et que le récepteur est présent à la membrane par immunobuvardage. La stimulation des cellules à la ghreline conduit aux phosphorylations de ERK1/2 et de Akt, lesquelles sont inhibées par un prétraitement des cellules avec un inhibiteur de PI3 kinase (LY294002) et un prétraitement avec un inhibiteur de Akt (SH-5). Ces résultats suggèrent que Akt, qui est activé par PI3 kinase, active la MAPK ERK1/2. Il existe donc une interrelation entre ces voies. Un effet semblable est observé avec la des-acyl ghreline, un analogue de la ghreline qui ne lie pas le GHS-R1a, suggérant l'implication d'un récepteur distinct du GHS-R1a. Malgré l'activation de voies impliquées dans la prolifération cellulaire, les deux formes de ghreline n'induisent pas l'incorporation de ³H-thymidine et de ³H-leucine dans les CMLV. Dans cette étude, nous démontrons que la ghreline et la des-acyl ghreline ne stimulent pas la prolifération des CMLV, mais elles activent la voie de PI3 kinase/Akt/ERK1/2 via possiblement un récepteur distinct du GHS-R1a. Suite à l'activation de cette voie, la survie cellulaire pourrait être une réponse cellulaire envisageable par la ghreline dans les CMLV.

Mots-clés : GHS-R1a, GHS, signalisation, prolifération, inhibiteur pharmacologique, LY294002, SH-5

Abstract

Ghrelin is the endogenous ligand of the GHS-R1a (growth hormone secretagogue receptor), which has a widespread tissue distribution. Many studies suggest that ghrelin and its receptor play a role during the development of atherosclerosis. However, this mechanism is unknown. During atherosclerosis, the vascular smooth muscle cells (VSMC) proliferate in abnormal manner. It is known that ghrelin has a proliferative effect on different cell types through PI3 kinase/Akt and ERK1/2 pathways. Therefore, we have raised the hypothesis that ghrelin may stimulate the VSMC proliferation via the PI3 kinase/Akt and ERK1/2 signaling pathways during atherosclerosis. First, we have shown by RT-PCR that *GHS-R1a* is expressed in VSMC and by Western blot that the receptor is present at membranes. Moreover, stimulation of VSMC with ghrelin increases phosphorylated ERK1/2 and Akt by Western blot analysis. Pretreatment of cells with the PI3 kinase inhibitor LY294002 inhibits the Akt and ERK1/2 phosphorylation. The Akt inhibitor SH-5 abolishes also these phosphorylations mediated by ghrelin. These findings suggest that Akt, which is activated by PI3 kinase, stimulates ERK1/2 protein in response to ghrelin. So, these results have shown that there is a possible crosstalk between these two signaling pathways. A reproducible stimulatory effect is observed with des-acyl ghrelin, a ghrelin analogue that does not bind GHS-R1a, suggesting the presence of novel receptor, which is distinct from GHS-R1a. Despite the activation of two signaling pathways implicated on cell proliferation, both ghrelin and des-acyl ghrelin do not significantly increase ^3H -thymidine and ^3H -leucine incorporation in VSMC. In this study, we have demonstrated that both ghrelin and des-acyl ghrelin do not promote VSMC proliferation, but activate the PI3 kinase/Akt/ERK1/2 pathway via possibly a receptor distinct from GHS-R1a. After the activation of this signaling pathway, the cell survival could be a possible cell response by ghrelin in VSMC.

Keywords: GHS-R1a, GHS, signaling pathway, proliferation, pharmacological inhibitor, LY294002, SH-5

1.3.7.3	La voie de PI3 kinase/Akt	22
1.3.8	La désensibilisation du GHS-R1a	24
1.4	La ghreline.....	25
1.4.1	Le ligand naturel du GHS-R1a	25
1.4.2	Caractérisation de la ghreline	26
1.4.3	Distribution tissulaire de la ghreline	30
1.4.4	Sécrétion et régulation de la sécrétion de la ghreline	31
1.5	Activités biologiques de la ghreline et de son récepteur.....	34
1.5.1	La relâche de l'hormone de croissance.....	34
1.5.2	Effets périphériques de la ghreline.....	35
1.5.3	Effets cardiovasculaires de la ghreline.....	42
1.5.4	Effets de la ghreline sur la prolifération et la survie cellulaires.....	44
1.5.5	Effets de la des-acyl ghreline via un récepteur distinct du GHS-R1a	47
1.5.6	La ghreline et les pathologies	48
1.6	Relation entre le système Ghreline/GHS-R1a et l'athérosclérose	49
1.6.1	L'athérosclérose.....	49
1.6.1.1	Introduction	49
1.6.1.2	Les stades de la formation des lésions athérosclérotiques.....	49
1.6.1.3	Les événements critiques de l'athérosclérose	53
1.6.1.4	Mécanismes moléculaires impliqués dans les cellules musculaires lisses vasculaires au cours de l'athérosclérose.....	55
1.6.1.4.1	Migration et prolifération cellulaires	56
1.6.1.4.2	Inflammation.....	60
1.6.1.4.3	Formation de cellules spumeuses	61
1.6.2	La ghreline et le GHS-R1a dans l'athérosclérose	65
1.7	Hypothèse de travail.....	69
2.0	Matériel et méthodes	71
2.1	Culture cellulaire.....	71
2.2	Stimulation des cellules	71

2.3	Extraction d'ARN total.....	72
2.4	RT-PCR.....	73
2.5	Extraction de protéines totales	74
2.6	Isolation de membranes cellulaires	74
2.7	Immunobuvardage.....	75
2.8	Immunoprécipitation et essai kinase.....	77
2.9	Mesure du taux de synthèse d'ADN et protéique	78
3.0	Résultats.....	80
3.1	Expression du GHS-R1a dans les cellules musculaires lisses vasculaires	80
3.1.1	Optimisation de la méthode de RT-PCR pour le gène du GHS-R1a	80
3.1.2	Détection du GHS-R1a dans les CMLV par RT-PCR	82
3.1.3	Détection du GHS-R1a dans les CMLV par immunobuvardage	83
3.2	Effet in vitro de la ghreline et de la des-acyl ghreline sur différentes voies de signalisation dans les cellules musculaires lisses vasculaires	83
3.2.1	Activation de la voie de ERK1/2 par la ghreline et la des-acyl ghreline dans les CMLV.....	84
3.2.2	Activation de la voie de PI3 kinase/Akt par la ghreline et la des-acyl ghreline dans les CMLV.....	85
3.2.3	La voie de PI3 kinase/Akt est impliquée dans l'activation de la voie de ERK1/2 en réponse à la ghreline et à la des-acyl ghreline dans les CMLV	86
3.3	Effet de la ghreline et de la des-acyl ghreline sur la prolifération cellulaire des cellules musculaires lisses vasculaires.....	88
3.3.1	Effet de la ghreline et de la des-acyl ghreline sur la synthèse d'ADN des CMLV	88
3.3.2	Effet de la ghreline et de la des-acyl ghreline sur la synthèse protéique des CMLV	90
4.0	Discussion.....	103

4.1	Expression du GHS-R1a dans les CMLV	103
4.2	Implication des voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2 dans les CMLV en réponse à la ghreline et à la des-acyl ghreline	106
4.3	Implication du ou des récepteurs, dont le GHS-R1a, dans l'action de la ghreline et de la des-acyl ghreline au niveau des CMLV.....	111
4.4	Effet de la ghreline et de la des-acyl ghreline sur la prolifération cellulaire	114
4.5	Voie de signalisation proposée dans les CMLV en réponse à la ghreline et à la des-acyl ghreline	116
4.6	Rôle de la ghreline dans l'athérosclérose?	119
5.0	Conclusions et perspectives.....	121
6.0	Références.....	124

Liste des tableaux

Tableau I : Pourcentage d'identité de séquence du GHS-R entre les espèces.....	9
Tableau II : Distribution tissulaire de l'expression du GHS-R1a et de la ghreline.....	11
Tableau III : Résumé des études publiées sur le rôle de la ghreline dans la prolifération et la survie de différents types de cellules.....	46

Liste des figures

Figure 1 : Régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance (GH).....	2
Figure 2 : Famille de GHS et types de récepteur auxquels les différents GHS se lient.....	4
Figure 3 : Représentation schématique du récepteur des GHS de type 1a (GHS-R1a).....	7
Figure 4 : Représentation schématique du gène humain du GHS-R1a.....	8
Figure 5 : Voie de transduction du signal du GHS-R1a dans les cellules somatotropes.....	17
Figure 6 : Voies de signalisation des MAPK.....	19
Figure 7 : Voie de signalisation de ERK1/2 suite à une stimulation d'un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) et aux intégrines.....	21
Figure 8 : Voie de signalisation de ERK1/2 suite à une stimulation d'un récepteur couplé aux protéines G.....	22
Figure 9 : Voie de signalisation de Akt.....	24
Figure 10 : Structure primaire de la ghreline humaine et de rat.....	27
Figure 11 : Variantes de ghreline : 28 ou 27 acides aminés et un groupement acyle possédant 8 à 11 atomes de carbone.....	27

Figure 12 : Représentation schématique du gène humain de la ghreline.....	28
Figure 13 : Rôles de la ghreline.....	36
Figure 14 : Schéma simplifié du développement de l'athérosclérose.....	51
Figure 15 : Voies de signalisation activées suite à la stimulation du récepteur du PDGF (PDGFR) dans les cellules musculaires lisses vasculaires	58
Figure 16 : Régulation du métabolisme des lipides.....	62
Figure 17 : Optimisation de la méthode de RT-PCR pour la détection de l'expression de <i>GHS-R1a</i> dans les CMLV.....	91
Figure 18 : Expression du <i>GHS-R1a</i> par RT-PCR et détection de la protéine par immunobuvardage dans les CMLV.....	93
Figure 19 : Activation de la voie de ERK1/2 par la ghreline et la des-acyl ghreline dans les CMLV.....	95
Figure 20 : Activation de la voie de PI3 kinase/Akt par la ghreline et la des-acyl ghreline dans les CMLV.....	97
Figure 21 : Interrelation entre les voies de PI3 kinase/Akt et ERK1/2 suite à une stimulation des CMLV à la ghreline et à la des-acyl ghreline.....	99
Figure 22 : Effet de la ghreline et de la des-acyl ghreline sur la prolifération des CMLV.....	101

Figure 23 : Schéma de la voie de signalisation hypopthétique activée par la ghreline et la des-acyl ghreline dans les CMLV.....117

Liste des sigles et abréviations

9-HODE	acide 9-hydroxy-octadéca-diénoate
13-HODE	acide 13-hydroxy-octadéca-diénoate
A	adénine
ABCA1	ATP-binding cassette A1
AC	adénylyl cyclase
ACTH	hormone adrénocorticotropique (adrenocorticotropic hormone)
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNase	acide désoxyribonucléase
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AgRP	agouti-related protein
Akt/PKB	protéine kinase B
Ala	alanine
AMPc	adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
AMPK	AMP-activated protein kinase
Ang II	angiotensine II
AP-1	activator protein-1
AP-2	activator protein-2
AP-4	activator protein-4
apoA1	apolipoprotéine A1
apoE	apolipoprotéine E
ARC	noyau arché (arcuate nucleus)
Arg	arginine
ARNc	acide ribonucléique synthétique complémentaire
ARNm	acide ribonucléique messenger
Asp	acide aspartique
AT1	récepteur de l'angiotensine II de type 1 (angiotensin II receptor type 1)
ATP-	adénosine triphosphate

BCA	acide bicinchoninique (bicinchoninic acid)
bFGF	basic fibroblast growth factor
bHLH	hélice-boucle-hélice basique (basic helix-loop-helix)
Bad	Bcl-2 associated death promoter
Bax	Bcl-2 associated x protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
B _{max}	liaison spécifique maximum (maximum specific binding)
Bpa	benzoïde phénylalanine
BSA	albumine de sérum bovin (bovine serum albumin)
C	cytosine
CCR2	C-C chemokine receptor 2
CD36	cluster designation 36, cluster of differentiation 36
CHO	Chinese hamster ovary
CMLV	cellules musculaires lisses vasculaires
CO ₂	dioxyde de carbone
COX-2	Cyclooxygénase de type 2
Cys	cystéine
DAG	1,2-diacylglycérol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMN	noyau dorsomédial (dorsomedial nucleus)
dNTP	désoxyribonucléosides triphosphates
DTT	1,4-dithiothreitol
EDTA	acide éthylènediamine tétraacétique (ethylenediamine tetraacetic acid)
EGF	facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor)
EGTA	ethyleneglycol-bis (2-amino-ethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	oxyde nitrique synthase endothelial (endothelial NOS)
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1 and 2
ET-1	endothéline-1

fmol/mg	fentomole/milligramme
FSH	follicle stimulating hormone
g	force centrifuge relative
G	guanine
GAPDH	glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase
GH	hormone de croissance (growth hormone)
GHRH	hormone stimulatrice de l'hormone de croissance (growth hormone releasing hormone)
GHRH-R	récepteur des GHRH (GHRH receptor)
GHRP	sécrétine peptidique de l'hormone de croissance (growth hormone releasing peptide)
GHS	sécrétine de l'hormone de croissance (growth hormone secretagogue)
GHS-R	récepteur des sécrétines de l'hormone de croissance (growth hormone secretagogue receptor)
Glu	acide glutamique
Gly	glycine
GnRH	gondotropin-releasing hormone
GPC-R	récepteur couplé aux protéines G (G protein coupled receptor)
GRB2	growth factor receptor binding protein 2
GTP	guanosine triphosphate
HDL	lipoprotéine de haute densité (high density lipoprotein)
HEK293	human embryonic kidney cell 293
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IFN γ	interféron gamma
IGF-1	human insulin-like growth factor 1
IgG	immunoglobuline G
I κ B	inhibitor of NF- κ B
IL-4	interleukine-4
IL-8	interleukine-8

IP ₃	inositol 1,4,5-triphosphate
IRS-1	insulin receptor substrate
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
kb	kilobases
K _d	constante de dissociation
kDa	kilodalton
LDL	lipoprotéine de faible densité (low density lipoprotein)
LDLox	lipoprotéine de faible densité oxydé
Leu	leucine
LH	luteinizing hormone
LPS	lipopolysaccharides
LXR α	liver-x-receptor alpha
M	molaire (mole/Litre)
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MBP	myelin basic protein
MCP-1	macrophage chemotactic protein-1
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MEK	MAPK/ERK activating kinase
min	minute
MgCl ₂	dichlorure de magnésium
mL	millilitre
MTT	3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Myb	myeloblastosis virus oncogene
NF-1	nuclear factor-1
NF-IL6	nuclear factor- interleukine-6
NF- κ B	nuclear factor- κ B
ng	nanogramme
nm	nanomètre
nM	nanomolaire
NO	oxyde nitrique

NO _i	oxyde nitrique inductible (inducible nitric oxide)
NPY	neuropeptide Y
Oct-1	octamer-binding factor
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
pb	paire de base
PBS	solution saline de phosphate (Phosphate buffer saline)
PEA-3	polyomavirus enhancer activator 3
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PDK1	3-phosphoinositide-dependent kinase 1
PEPCK	phosphoénolpyruvate carboxykinase
PI	phosphoinositides
PI3 kinase	phosphatidylinositol 3-kinase
Pit-1	pituitary-specific transcription factor 1
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PIP ₃	phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PGJ ₂	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J ₂
Phe	phénylalanine
PKA	protéine kinase A
PLC	phospholipase C
PKB	protéine kinase B
PKC	protéine kinase C
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PNPP	p-nitrophényl phosphate
POU	conserved region in <u>pit</u> -1, <u>oct</u> -1, <u>oct</u> -2 and <u>unc</u> -86 proteins
PPAR _{γ}	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPRE	PPAR response element
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
PVN	noyau paraventriculaire (paraventricular nucleus)
Raf	protein kinase oncoprotein

Ras	rat sarcoma
ROS	reactive oxygen species
RPA	RNase protection assay
RT	transcription inverse (reverse transcription)
RT-PCR	reverse transcription - polymerase chain reaction
RXR	récepteur X de l'acide rétinoïque (retinoid X receptor)
Ser	sérine
SDS	dodécylsulfate de sodium (sodium dodecyl sulfate)
SDR	rat spontanément nain (spontaneous dwarf rat)
Shc	SH2-containing α_2 collagen-related proteins
Sos	son of sevenless
SP-1	stimulatory protein-1
SR	récepteur scavengeur (scavenger receptor)
SR-B1	récepteur scavengeur de classe B1
STAT	signal transducer and activator of transcription
T	thymine
T3	triiodothyronine
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
TCA	acide trichloroacétique (trichloroacetic acid)
TGF β	facteur de croissance tumoral beta (tumor growth factor beta)
TNET	Tris-HCl, NaCl, EDTA, Triton X-100
TNF- α	facteur nécrosant des tumeurs alpha (tumor necrosis factor alpha)
TPA	12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TSH	thyroid-stimulating hormone
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP nick-end labeling
Tyr	tyrosine
TZD	thiazolidinedione
USF	upstream regulatory factor
VCAM-1	vascular cellular adhesion molecule-1

VLDL	lipoprotéine de très faible densité (very low density lipoprotein)
VMN	noyau ventromédial (ventromedial nucleus)
vs	versus
ZG	zone glomérulée (<i>zona glomerulosa</i>)

À tous ceux et celles qui croient en moi

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Huy Ong, pour son accueil dans son laboratoire en tant qu'étudiante à la maîtrise et pour m'avoir appris de nombreuses connaissances en sciences et en recherche. Je tiens aussi à remercier mon co-directeur de recherche, Dr Marc Servant, pour ses connaissances et son aide en biologie moléculaire et pour ses encouragements. Merci au Dr Sylvie Marleau pour ses conseils, pour l'organisation des petites fêtes et les présents lors de nos anniversaires.

Merci à Annie, François, Petra, Kim, Christian et Mansouria pour leur présence, leur aide et leurs conseils et pour le plaisir que nous avons eu à jaser, travailler et participer aux activités.

Merci aux membres du laboratoire du Dr Marc Servant pour leur présence, leurs conseils et de m'avoir toléré lors de mes nombreuses visites dans leur labo. Un merci tout particulier à Valérie et Simon-Pierre avec qui j'ai eu la chance de faire quelques expériences.

Merci aux membres du laboratoire du Dr Sylvie Marleau pour leur présence aux lab-meetings et aux petites fêtes organisées par Sylvie. Merci à Ève-Marie pour s'être occupée de mes souris lors de mes études *in vivo* et pour son aide et son expertise en prélèvement de tissus.

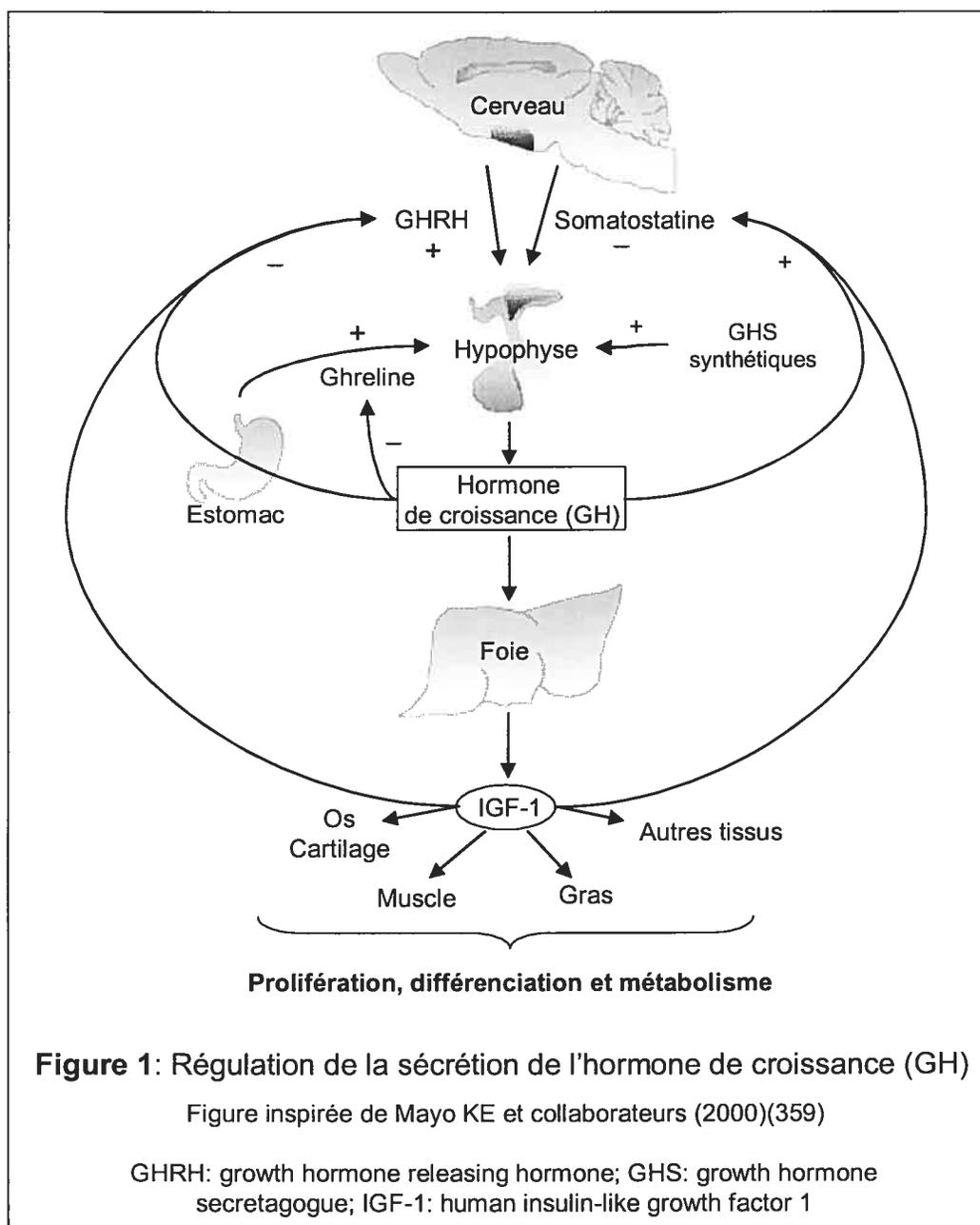
Sans oublier, je voudrais remercier mes parents et mon frère qui seront toujours là pour moi, mes amies Marie-Ève L, Isabelle, Marie-Ève F, Joëlle, Stéphanie, Maud et Geneviève ainsi que leurs copains pour leur précieuse amitié et leurs encouragements. Je suis très privilégiée d'avoir des amies aussi géniales qu'elles. Finalement, je remercie la personne qui compte énormément dans mon cœur, mon amoureux Jean-Nicholas, pour tout ce qu'il fait pour moi.

1.0 Revue de littérature

1.1 Introduction

L'hormone de croissance (GH) est essentielle à la bonne croissance des enfants et joue plusieurs rôles chez l'adulte pour maintenir un corps en santé. Entre autres, la GH aide à réguler les quantités de graisses, d'eau et de muscles dans l'organisme. Elle affecte également la composition de l'os et les niveaux de cholestérol dans le sang. Sa sécrétion par l'hypophyse est régulée par deux types de peptides hypothalamiques : la GHRH (growth hormone releasing hormone) et la somatostatine. La GHRH régule de façon positive la relâche de la GH alors que la somatostatine inhibe la sécrétion de cette hormone (Figure 1) (1).

Chez plusieurs personnes, une quantité insuffisante de GH est produite par l'hypophyse, résultant d'une déficience en GH dans l'organisme. Cette déficience occasionne des troubles de croissance chez les enfants et des problèmes au niveau du comportement, un manque d'énergie et un besoin accru de sommeil chez les adultes. Des techniques de génie génétique (technologie recombinante) sont utilisées pour produire de la GH biosynthétique, identique à celle naturelle, afin de remédier à la déficience en GH suite à l'injection de l'hormone synthétique. Cependant, cette thérapie a plusieurs inconvénients, dont une faible biodisponibilité et des effets secondaires lors de l'administration (2). Pour améliorer cette thérapie existante, les équipes de recherche ont identifié des composés synthétiques capables de mimer ou d'amplifier la relâche de la GH : les sécrétines de l'hormone de croissance (GHS).



1.2 Les sécrétines de l'hormone de croissance (GHS)

Au cours des années, les études sur les sécrétines de l'hormone de croissance ont conduit au développement de trois classes de GHS synthétique: les GHS peptidiques (GHRP), les GHS non peptidiques (dérivés du benzolactame) et les peptidomimétiques (dérivés des spiroindolanes) (Figure 2). Les premières molécules GHS à être synthétisées ont été les GHRP (growth hormone releasing peptide) dans les années 70 (3). Le GHRP-6 a été le premier hexapeptide à permettre une relâche active de l'hormone de croissance dans des études *in vivo* chez l'homme par administration orale, via un mécanisme distinct de celui de la GHRH. La GHRH se lie à un récepteur spécifique de l'hypophyse pour stimuler la synthèse et la relâche de la GH : le GHRH-R (GHRH receptor) (4). Ce récepteur est membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Le principal problème retrouvé chez le peptide GHRP-6 était sa faible biodisponibilité et une relâche de la GH de courte durée (5;6). D'autres GHRP ont par la suite été découverts, dont le GHRP-1, le GHRP-2 et l'hexaréline, lesquels s'avéraient plus efficaces que le GHRP-6. Le développement des GHS non peptidiques (exemple : L-692,429, L-692,585) et ceux de type peptidomimétique (exemple : MK-0677), basé sur la structure du GHRP-6, a permis d'améliorer la biodisponibilité et la pharmacocinétique des GHS dans l'organisme, tout en restant de puissants sécrétagogues de l'hormone de croissance. Le MK-0677, synthétisé en 1995, est le peptidomimétique qui a le plus été étudié, puisqu'il avait une très grande biodisponibilité et il était en mesure d'augmenter la sécrétion de la GH même après 24 heures (h) de son administration orale (7;8). Les études du MK-0677 ont permis la découverte du récepteur des GHS synthétiques impliqué dans la relâche de l'hormone de croissance : le récepteur des sécrétines de l'hormone de croissance (GHS-R) (9).

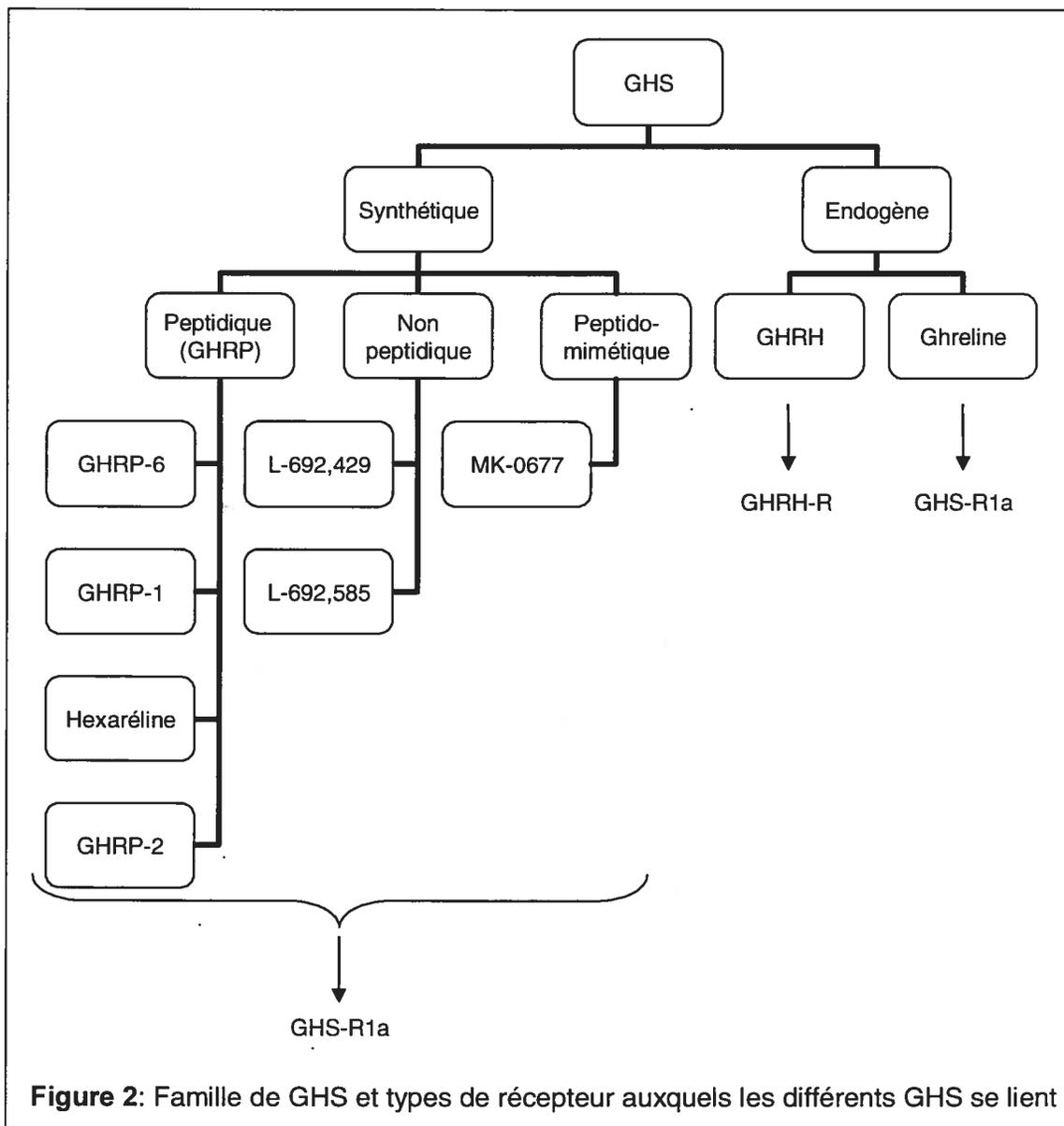


Figure 2: Famille de GHS et types de récepteur auxquels les différents GHS se lient

1.3 Le récepteur des sécrétines de l'hormone de croissance

1.3.1 La découverte du GHS-R

L'existence d'un récepteur sélectif aux GHS était évidente, puisque ces molécules stimulent la relâche de l'hormone de croissance via un mécanisme différent de celui de la GHRH (liaison au GHRH-R) au niveau de l'hypophyse. Des études ont montré que les GHS causaient une dépolarisation des cellules somatotropes de l'hypophyse et une inhibition de leurs canaux potassiques. Une augmentation des concentrations intracellulaires de calcium et d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et une activation de la protéine kinase C (PKC) ont également été observées (10-12). Ces caractéristiques biochimiques mettaient en évidence l'activation possible d'un récepteur à 7 passages transmembranaires couplé aux protéines G (GPC-R). L'activation d'un GPC-R a été confirmée par l'observation d'une liaison dépendante du Mg²⁺, laquelle est inhibée par un analogue stable de guanosine triphosphate (GTP) (9).

C'est en 1996 que Howard et collaborateurs ont découvert le récepteur des sécrétines de l'hormone de croissance (GHS-R: growth hormone secretagogue receptor) par des études de liaison du MK-0677 marqué au ³⁵S. L'acide ribonucléique messager (ARNm) poly (A)⁺ d'hypophyses de porc a été isolé comme source d'ARNm du GHS-R et ce dernier a été injecté aux ovocytes de Xénopus. Les ovocytes ont ensuite été exposés au MK-0677 et les courants membranaires ont été enregistrés. L'observation d'une hausse des courants calciques à la membrane induite par l'augmentation du calcium intracellulaire indiquait la présence du GHS-R. Des ARN synthétiques complémentaires (ARNc) codant pour la protéine aequorine bioluminescente sensible au calcium et des ARNc de sous-unités α des protéines G ont été co-injectés aux ovocytes pour augmenter la sensibilité des essais. Seule une co-injection des ARNc de la sous-unité G _{α q}, membre de la famille des protéines

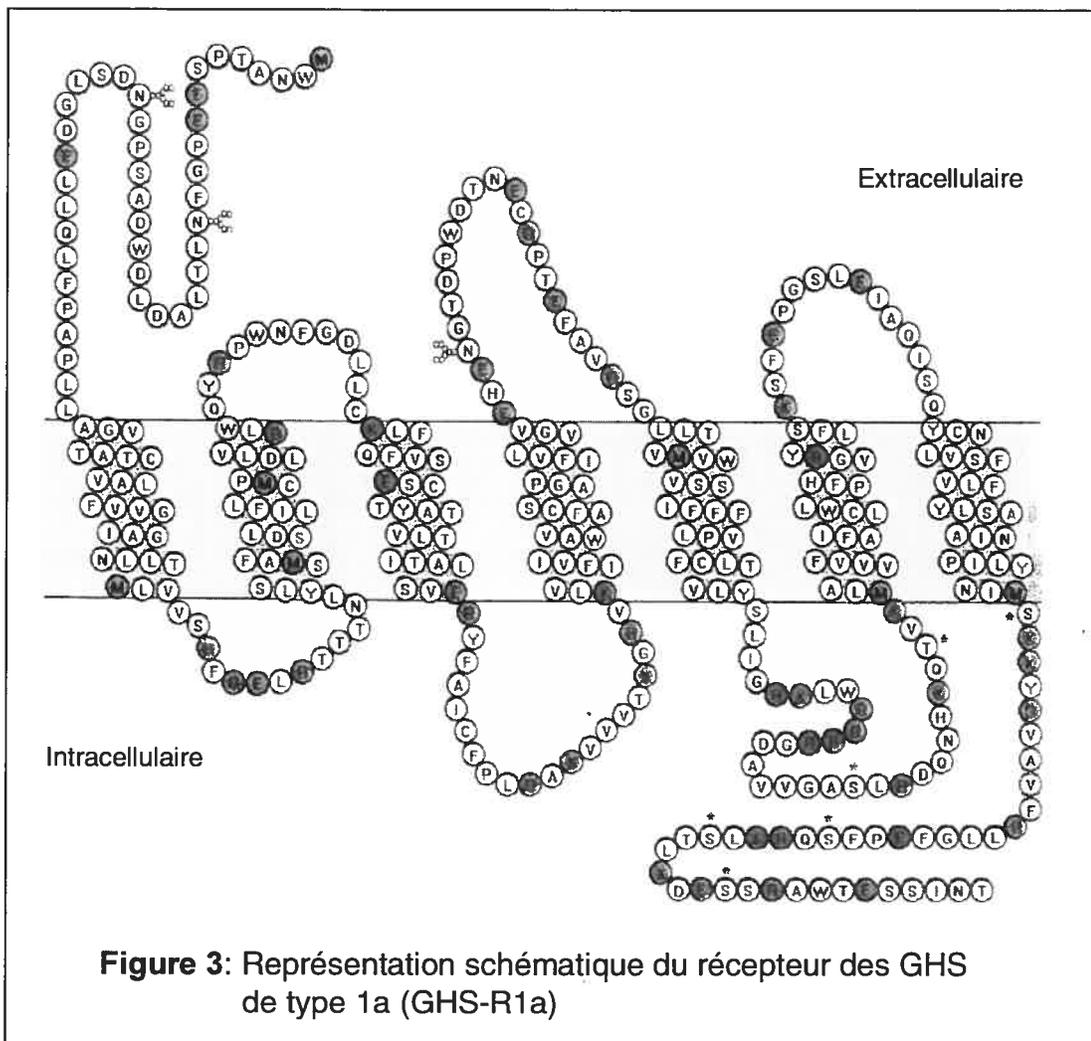
G₁₁, donnait une réponse en présence du MK-0677. Cette observation suggérait la présence d'un récepteur couplé à G_{αq} dans la glande hypophysaire qui répondait aux stimulations du MK-0677. Finalement, cet essai a été utilisé pour l'analyse d'environ 10 000 complexes d'ARNc non fractionnés d'hypophyses de porc, permettant ainsi l'identification d'un seul clone d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) qui codait pour le GHS-R. La séquence de nucléotides de l'ADNc obtenue révélait une structure typique des récepteurs couplés aux protéines G : 7 passages transmembranaires, 3 boucles intracellulaires, 3 boucles extracellulaires, une signature GPC-R (Glu, Arg, Tyr) et des sites potentiels de glycosylation et de phosphorylation. (9) Cette étude a permis la découverte d'un nouveau membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G qui joue un rôle important dans la relâche de l'hormone de croissance.

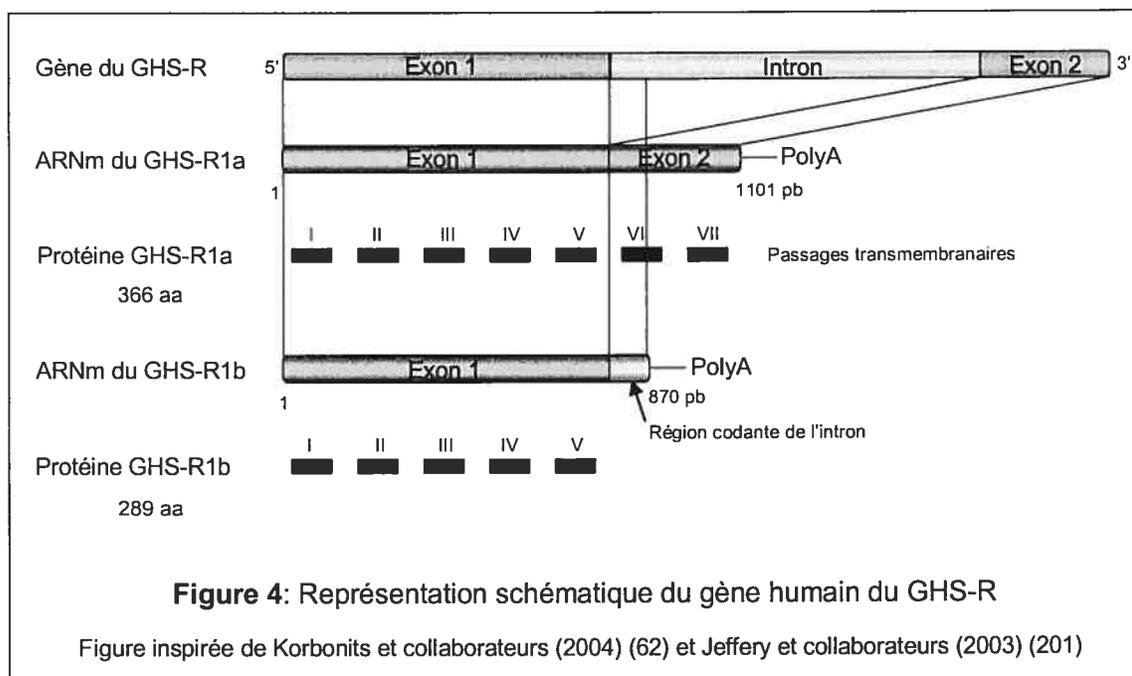
1.3.2 Caractérisation du gène et de la protéine du GHS-R

Le gène du GHS-R humain est situé sur le chromosome 3q26.2 (13). Le clonage de ce récepteur par Howard et collaborateurs a permis d'identifier deux types d'ADNc du GHS-R: 1a et 1b (9). Le GHS-R de type 1a encode pour un récepteur de 366 acides aminés contenant 7 passages transmembranaires (environ 41 kDa; Figure 3). Il n'a pas encore été démontré que le type 1b est traduit en protéine *in vivo*, mais il encoderait pour une protéine de 289 acides aminés avec seulement 5 régions transmembranaires (9).

Les types 1a et 1b dérivent du même gène par épissage alternatif (9) (Figure 4). Ce gène, mesurant 4,3 kilobases (kb), est constitué de 2 exons séparés d'un intron d'environ 2 kb. Les deux sous-types du récepteur ont le même codon d'initiation de la traduction situé dans le premier exon. Le premier exon possède une région non traduite en 5' et encode pour les 265 premiers acides aminés représentant les passages transmembranaires 1 à 5. L'intron,

enlevé par épissage, n'est pas traduit en protéine de type 1a. Cependant, la forme 1b du GHS-R possède 24 acides aminés provenant de l'intron, ce qui est très rarement observé dans la synthèse d'une protéine. Le deuxième exon possède une région non traduite en 3' et il code pour les 101 derniers acides aminés du type 1a, correspondant aux régions transmembranaires 6 et 7 (14).





Comme les autres récepteurs couplés aux protéines G, le GHS-R1a possède 7 hélices α à la membrane, trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires (Figure 3) (15). Un motif hautement conservé responsable de l'interaction avec les protéines G (Asp/Glu Arg Tyr) a été trouvé sur la 2^e boucle intracellulaire et des cystéines situées au niveau de la première boucle extracellulaire ont la capacité de faire des ponts disulfures (Cys-115 et Cys-197) (15).

Contrairement au type 1a, le récepteur de type 1b ne semble pas stimuler la relâche de l'hormone de croissance ni d'augmenter la concentration intracellulaire du calcium dans la cellule. L'équipe de Howard et collaborateurs a confirmé par des études de compétition que la liaison du [³⁵S] MK-0677 était de haute affinité, saturable et spécifique ($K_d=0,4$ nM et $B_{max}=800$ fmol/mg) au GHS-R1a, mais non, au GHS-R1b (9).

1.3.3 Homologie entre les espèces

Des analyses moléculaires du récepteur des sécrétines de l'hormone de croissance ont démontré que ce récepteur est hautement conservé dans l'évolution. En effet, il a été rapporté qu'il y avait une très grande identité de séquence de la protéine entre les différentes espèces étudiées : le porc, l'humain, le rat, la souris et le chien (Tableau I). Le GHS-R1a humain partage 96,1% et 93,1% d'identité de séquence avec le GHS-R1a de rat et de porc respectivement (13). Les séquences de la souris et du rat diffèrent de seulement 2 acides aminés entre elles, soit une homologie de séquence de 99% (15). Le GHS-R1a des rongeurs (rat et souris) possède deux acides aminés en moins que celles humaine et porcine. La perte d'un premier acide aminé a été identifiée dans le domaine extracellulaire N-terminal et d'un second, dans la deuxième boucle intracellulaire (15). Un pourcentage de 94,5 a été observé entre les protéines de porc et de rat (13). La séquence d'acides aminés du GHS-R qui diverge le plus des autres espèces est celle retrouvée chez le chien. Le GHS-R de chien possède un segment de 17 acides aminés en N-terminal du domaine extracellulaire, manquant chez les autres espèces (15).

Espèces	% d'identité
Humain vs porc	93,1
Humain vs rat	96,1
Porc vs rat	94,5
Rat vs souris	99
Chien vs humain	89
Chien vs porc	89
Chien vs rat	91

Tableau I: Pourcentage d'identité de séquence du GHS-R entre les espèces

Des études d'alignement de séquence ont révélé que la séquence du GHS-R ne montre pas d'homologie significative avec d'autres récepteurs connus. Cependant, il a été rapporté que le GHS-R avait une identité de séquence de 51,6% et de 34,9% avec les récepteurs de la motiline et de la neurotensine respectivement (16).

1.3.4 Distribution tissulaire du GHS-R1a

1.3.4.1 Expression du GHS-R1a dans l'hypophyse et l'hypothalamus

Suite au clonage du GHS-R1a dans l'hypophyse, des études de distribution tissulaire du récepteur par RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) en temps réel ont montré qu'en effet l'ARNm du GHS-R1a est exprimé de façon prédominante au niveau de l'hypophyse, l'hypothalamus et du cerveau, sites d'action des GHS (Tableau II) (17-19). Dans l'hypophyse, le GHS-R1a est principalement exprimé dans les cellules somatotropes (9;20). L'utilisation des techniques d'hybridation *in situ* et de RPA (RNase protection assay) a montré une détection de l'ARNm du GHS-R1a dans plusieurs noyaux de l'hypothalamus, dont l'ARC (noyau arché), le PVN (noyau paraventriculaire) et le VMN (noyau ventromédial) (17;21). De plus, d'autres parties du cerveau expriment le GHS-R1a, telles que l'hippocampe, le cortex cérébral et le bulbe rachidien (17;18;21-23). La détection de l'expression du GHS-R1a dans le cerveau est consistante avec son action dans la régulation de la relâche de l'hormone de croissance.

1.3.4.2 Expression du GHS-R1a dans les tissus périphériques

Pour mieux comprendre les rôles physiologiques du GHS-R, plusieurs équipes ont étudié l'expression de l'ARNm du GHS-R1a dans les tissus périphériques (Tableau II). Les études réalisées ont montré des résultats

différents quant à l'expression du récepteur des sécrétines de la GH dans les différents tissus. Cette controverse pourrait être expliquée par l'utilisation de diverses techniques qui diffèrent dans leur sensibilité et leur spécificité (Northern Blotting, RPA, hybridation *in situ*, RT-PCR classique et en temps réel). De plus, le problème souvent rencontré lors d'études de RT-PCR est l'utilisation d'amorces situées sur le même exon du gène GHS-R1a. Il est alors impossible de discriminer entre l'expression des deux sous-types de récepteur.

(19)

Tissus ou type cellulaire	Expression du GHS-R1a	Expression de la ghreléine	Méthode utilisée	Référence
Hypophyse	x	x	Hybridation <i>in situ</i> , Immunohistochimie, RPA, RT-PCR, Test de liaison	(9; 17-19; 22; 24; 32; 44; 46; 47)
Adénome hypophysaire	x	x		(43-48)
Hypothalamus (ARC, PVN, VMN)	x	x	Hybridation <i>in situ</i> , Immunohistochimie, RPA, RT-PCR	(9; 17; 18; 21-24; 46; 83)
Estomac	x	x	Hybridation <i>in situ</i> , Immunohistochimie, RT-PCR	(19; 24; 87; 95; 96)
Tumeur d'estomac	x	x		(51)
Aorte	x	x	Immunohistochimie, RT-PCR, Test de liaison	(25; 26; 42)
Cardiomyocyte	x	x	Immunohistochimie, RT-PCR	(27)
Cellules immunitaires (lymphocytes T et B, neutrophile, monocyte)	x	x	RT-PCR	(19; 28)
Cellule musculaire lisse vasculaire	x		RT-PCR	(26)
Cerveau (bulbe rachidien, cortex cérébral, hippocampe)	x		Hybridation <i>in situ</i> , RPA, RT-PCR	(17; 18; 21-23)
Foie		x	RT-PCR	(19)
Hépatome	x			(52)
Ganglion lymphatique		x	RT-PCR	(19)
Glande surrénale	x	x	RT-PCR, Test de liaison	(19; 32)
Intestin		x	Immunohistochimie, RT-PCR	(19; 26; 95)
Tumeur intestinale		x		(51)
Muscle		x	RT-PCR	(19)
Myocarde (ventricule et oreillette gauches)	x	x	Immunohistochimie, RT-PCR, Test de liaison	(19; 25; 26; 42)

Tableau II: Distribution tissulaire de l'expression du GHS-R1a et de la ghreléine

Tissus ou type cellulaire	Expression du GHS-R1a	Expression de la ghreline	Méthode utilisée	Référence
Ostéoblaste	x	x	RT-PCR	(29-31)
Ovaire	x	x	Immunohistochimie, RT-PCR, Test de liaison	(19; 32; 33; 175)
Pancréas	x	x	RPA, RT-PCR	(17; 19)
Adénocarcinome pancréatique	x			(44; 49)
Peau		x	RT-PCR	(19)
Placenta		x	RT-PCR	(19; 176)
Poumon	x	x	Hybridation <i>in situ</i> , Immunohistochimie, RT-PCR	(19; 34)
Prostate	x	x	RT-PCR	(19; 35)
Cellule cancéreuse de prostate	x	x	Immunohistochimie	(35)
Rate	x	x	RT-PCR	(19)
Rein	x	x	RT-PCR	(18; 19; 36)
Sein		x	RT-PCR	(19)
Carcinome mammaire	x		RT-PCR, test de liaison	(50)
Thyroïde	x	x	RT-PCR, Test de liaison	(19; 32)
Carcinome thyroïdien		x		(97; 98)
Testicule	x	x	Hybridation <i>in situ</i> , Immunohistochimie, RPA, RT-PCR, Test de liaison	(19; 32; 37-39; 179)
Tumeur testiculaire	x	x		(39)
Tissus adipeux	x	x	RT-PCR	(19; 40; 41)
Vasculature (artère coronarienne et pulmonaire)	x		Test de liaison	(42)
Veine		x	RT-PCR	(19)

Tableau II (suite): Distribution tissulaire de l'expression du GHS-R1a et de la ghreline

Suite à l'analyse des différentes études sur l'expression du GHS-R1a, le tableau II montre les tissus et les types cellulaires qui expriment le GHS-R1a. Principalement, le récepteur des sécrétines de l'hormone de croissance est exprimé au niveau de la thyroïde, du pancréas, de la rate, du myocarde et de la glande surrénale (19). De façon non négligeable, ce récepteur est également retrouvé dans l'estomac (24), l'aorte (25;26), le cardiomyocyte (27), le lymphocyte T et monocyte (28), la cellule musculaire lisse vasculaire (26), l'ostéoblaste (29-31), l'ovaire (32;33), le poumon (34), la prostate (35), le rein (18;36), le testicule (32;37-39), le tissu adipeux (40;41) et les artères coronarienne et pulmonaire (42). Ces expressions sont toutefois plus faibles que celles retrouvées dans l'hypophyse et l'hypothalamus. De plus, des études ont montré par RT-PCR que le GHS-R1a est aussi exprimé dans une variété de

tumeurs hypophysaires (43-48), pancréatiques (44;49), mammaires (50), testiculaires (39), d'estomac (51), de foie (52) et de prostate (35).

En ce qui concerne l'expression du GHS-R de type 1b, les études de RT-PCR en temps réel révèlent que l'ARNm du type 1b est exprimé de façon ubiquitaire dans tous les tissus testés (19).

1.3.5 Caractérisation du promoteur

L'analyse et la caractérisation du promoteur sont essentielles pour étudier la régulation du GHS-R. En effet, l'isolement du clone génomique GHS-R humain a permis la caractérisation de la séquence du promoteur de 2,7 kb approximativement (14). La région du promoteur du GHS-R ne contient pas de boîtes TATA, CAAT et GC, habituellement retrouvées dans la plupart des promoteurs (14;53), mais plusieurs séquences d'éléments initiateurs ont été découvertes autour du site d'initiation de la transcription (14). De nombreux sites de liaison de facteurs de transcription ont été identifiés dans le promoteur du GHS-R1a par homologie de séquence, incluant les facteurs AP-1 (activator protein-1), AP-4, les séquences consensus pour le facteur nucléaire NF-1 (nuclear factor-1), SP-1 (stimulatory protein-1) et le facteur régulateur USF (upstream regulatory factor) (14). De plus, plusieurs sites de liaison pour des facteurs transcriptionnels spécifiques aux tissus, tels que le facteur du domaine POU (conserved region in pit-1, oct-1, oct-2 and unc-86 proteins), Oct-1 (octamer-binding factor), ainsi que Pit-1 (pituitary-specific transcription factor 1) et Brn-2, ont été identifiés (14). Le promoteur du GHS-R1a contient des motifs consensus présents dans des éléments inductibles du promoteur qui peuvent lier des facteurs transcriptionnels provenant de stimuli exogènes. En effet, cette région du promoteur possède des sites de liaison pour les récepteurs des oestrogènes, des glucocorticoïdes et des hormones thyroïdiennes (14). Une étude a aussi rapporté l'existence d'autres éléments de réponse possibles

pouvant lier les facteurs AP-2, bHLH (basic helix-loop-helix), PEA-3 (polyomavirus enhancer activator 3), Myb (myeloblastosis virus oncogene) et NF-IL6 (nuclear factor- interleukine-6) (53). La présence de ces éléments de réponse sur le promoteur du GHS-R1a peut aider à orienter des études relatives à la régulation de l'expression du récepteur.

1.3.6 Régulation de l'expression du GHS-R1a

La caractérisation du promoteur du GHS-R a permis de mettre en évidence des éléments de réponse à différentes hormones pouvant agir sur la régulation de l'expression du GHS-R1a. En effet, il a été montré que l'expression du GHS-R1a est régulée par les oestrogènes, les glucocorticoïdes et les hormones thyroïdiennes. Ces trois types d'hormones ainsi que la GHRH régulent de façon positive l'expression du GHS-R1a. Cependant, des traitements à la GH ou aux GHS (dans certains cas) diminuent l'expression du récepteur.

Des études chez le rat nain spontané (SDR) ont montré une augmentation de l'expression du GHS-R1a dans l'hypophyse avec une réduction significative de son expression suite à un traitement à la GH (22;54;55). Une situation similaire est observée chez des rats déficients en GH où l'expression du GHS-R1a dans l'ARC et le VMN est sensible à la GH (21). Étrangement, l'expression du GHS-R1a chez ces femelles non traitées est supérieure à celle des mâles (54). Cette observation peut être expliquée par une quantité plus abondante d'oestrogènes chez les femelles. En effet, une étude a montré que le VMN du cerveau exprime de façon plus importante le GHS-R1a chez le rat femelle normal comparativement au mâle (21), et qu'une augmentation de son expression est observée chez des rats traités aux oestrogènes (56).

Des études chez des rats adrénalectomisés ont montré une réduction importante de l'expression de l'ARNm du GHS-R1a dans l'hypophyse et l'hypothalamus (ARC et VMN) et son expression est augmentée par une administration de la dexaméthasone (glucocorticoïde synthétique) (57;58). La dexaméthasone agit sur la transcription du gène. Cette régulation positive induite par ce glucocorticoïde est aussi observée dans des cellules hypophysaires en culture (57). Ces études suggèrent que les stéroïdes des surrénales sont nécessaires à l'expression normale du GHS-R1a (58). Cependant, une inhibition de l'activité du promoteur du GHS-R1a d'environ 50% a été observée dans des cellules hypophysaires en culture (GH₄) après un traitement aux glucocorticoïdes (hydrocortisol) (14). Une étude semblable a aussi démontré une faible inhibition de l'activité du promoteur du GHS-R1a dans des cellules GH3 (59).

Les hormones thyroïdiennes régulent également de façon positive l'expression du GHS-R1a. En effet, il a été montré dans une première étude que l'hormone triiodothyronine (T3) augmente significativement les niveaux de l'expression du GHS-R1a dans des cellules primaires en culture en augmentant sa stabilité (60). Une seconde étude montre que cette hormone stimule l'activité du promoteur du GHS-R1a dans des cellules hypophysaires GH₄ (14). Par contre, aucun effet n'a été détecté dans d'autres essais *in vitro* similaires (59).

Contrairement à un traitement à la GH, la GHRH régule positivement les niveaux d'ARNm du GHS-R1a. Il a été rapporté qu'un traitement à la GHRH chez des rats augmente significativement l'expression du GHS-R1a via un mécanisme indépendant de la GH. Cette même étude a montré que l'action de la GHRH ne serait pas directe sur les cellules hypophysaires, puisque aucun changement d'expression du GHS-R1a n'a été observé *in vitro* (61). Une autre étude a également rapporté que la Forskoline, un activateur de la PKA

(protéine kinase A) qui mime l'action de la GHRH, ne modifie pas l'activité du promoteur du GHS-R1a lors d'essais à la luciférase (59). Il a donc été suggéré que la GHRH agit de façon indirecte sur l'expression du GHS-R1a, en modulant des facteurs hypophysaires importants (62).

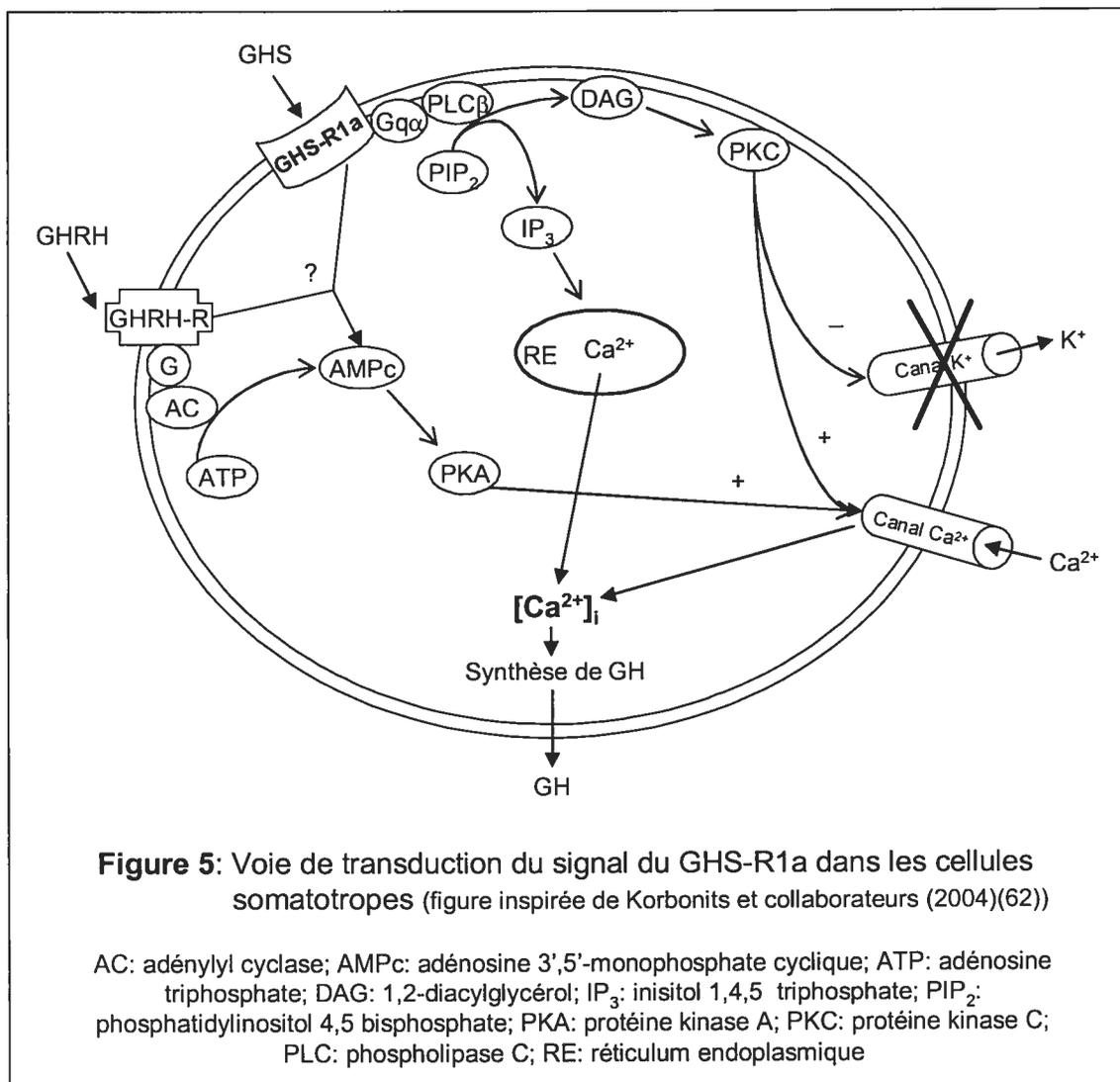
De façon générale, les GHS semblent réguler de façon négative l'expression de l'ARNm du GHS-R1a. Une première étude chez des rats normaux a montré qu'une injection sous-cutanée continue de deux semaines au peptide GHRP-6 ne modifie pas l'expression du GHS-R1a dans l'hypothalamus (ARC et VMN) (21). Cependant, une diminution de 50% du niveau d'expression du GHS-R1a a été observée chez le rat suite à une injection intraveineuse de 4 h avec le GHS non peptidique L-692,585 (61). L'inhibition de l'expression par son propre ligand a aussi été remarquée pour le récepteur de la GHRH (GHRH-R) (61). Une autre étude a aussi montré une réduction significative de l'activité transcriptionnelle du promoteur du GHS-R1a chez des cellules hypophysaires GH3 après un traitement simultané au TPA (12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate) et au Bay K8644, des activateurs connus du signal des GHS (59).

1.3.7 Les voies de transduction du signal du GHS-R1a

1.3.7.1 Voies impliquées dans l'augmentation du calcium intracellulaire

Le récepteur des sécrétines de l'hormone de croissance est un membre de la famille des récepteurs couplés à la protéine G_q (9;63). L'activation du GHS-R1a par les GHS mène à l'augmentation du calcium intracellulaire dans la cellule (Figure 5) (9;11). Suite à son activation, le GHS-R1a (sous-unité G_α) active la phospholipase C β (PLC- β) à la membrane qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) (64;65). Les produits résultant de cette hydrolyse sont : l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol

(DAG) (12). L'IP₃ agit sur son récepteur situé à la surface du réticulum endoplasmique (RE) pour libérer le calcium (Ca²⁺) dans le cytoplasme. Quant au DAG, il active la protéine kinase C (PKC), laquelle est associée à l'inactivation des canaux potassiques (K⁺). L'inhibition de ces canaux cause une dépolarisation de la cellule, une ouverture des canaux calciques de type L à voltage dépendant et ainsi, une entrée du calcium extracellulaire. Ces deux mécanismes d'augmentation du calcium intracellulaire via le GHS-R ont été observés dans une étude du mécanisme d'action du GHRP-6 dans les cellules somatotropes (66). La ghreline, le ligand naturel du GHS-R1a, stimule aussi l'augmentation du calcium intracellulaire dans ce type cellulaire (67). (62;68;69)

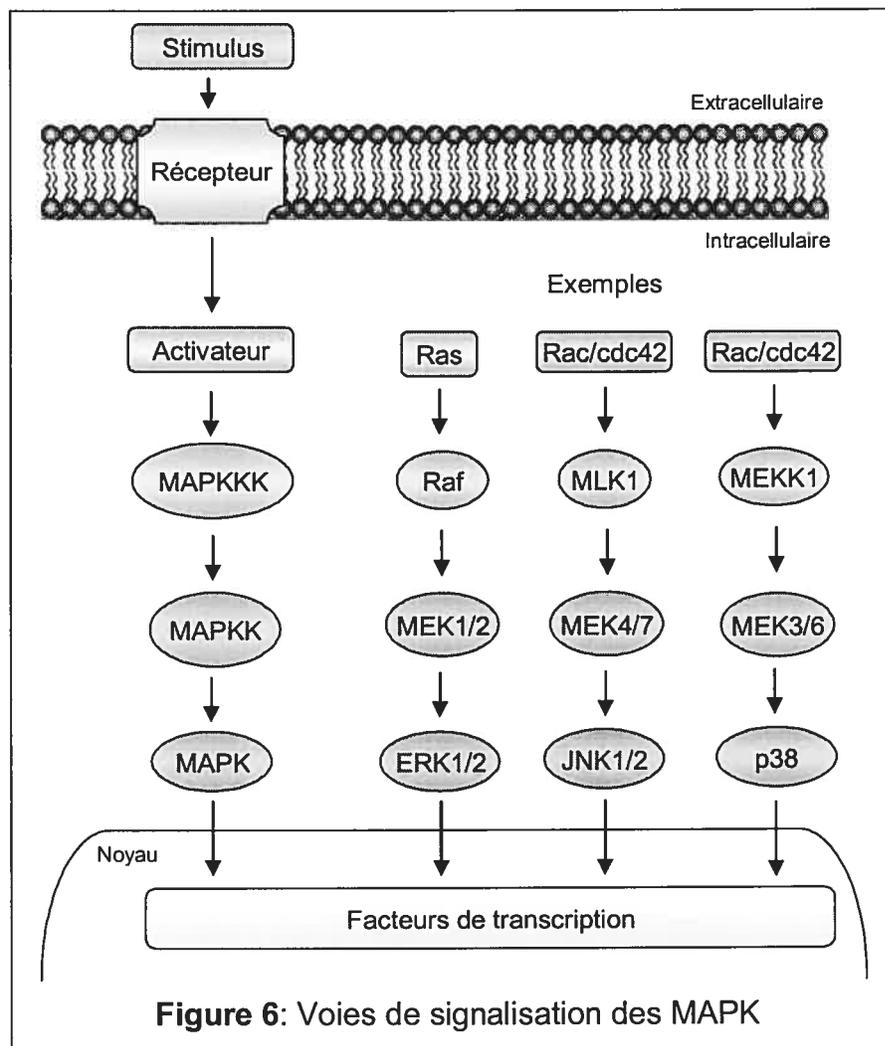


Plusieurs études ont montré une activation de l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPc) par le GHS-R1a, mais cette activation ne semble pas être prédominante. Il a été rapporté que le GHRP-6 n'a pas d'effet direct sur les niveaux d'AMPc dans les somatotropes, mais une augmentation synergique d'AMPc est observée en présence de la GHRH (70;71). Ces effets synergiques avec la GHRH ont aussi été observés avec le L692,429 (72;73) et la ghreline (73;74). Les GHS agissent donc de façon synergique avec la GHRH pour augmenter l'AMPc, ce qui suggère une interrelation entre la voie de signalisation du GHS-R1a et celle du GHRH-R. Une coactivation des récepteurs des GHS et de la GHRH augmente l'AMPc comparativement à l'activation du récepteur de la GHRH seul (73). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des sous-unités G_{β} et G_{γ} , PLC et PKC n'a eu aucun effet sur la production d'AMPc induite par les GHS et la GHRH. Ces résultats suggèrent une interaction directe entre les deux types de récepteurs pour l'amplification de l'AMPc (Figure 5) (73). Contrairement à ces études, d'autres ont montré que la ghreline (67) et le GHRP-2 (68) peuvent stimuler seuls la production d'AMPc dans les somatotropes via le GHS-R1a, lequel activerait l'adénylyl cyclase (AC) pour produire l'AMPc. Un modèle d'interrelation entre les voies de PKC et de AMPc/PKA dans les somatotropes a été proposé : le GHS-R1a serait couplé aussi bien à l'AC (sous-unités $G_{\beta\gamma}$ du GHS-R1a) qu'à la PLC (sous-unité G_{α} du GHS-R1a), lesquelles activent PKA et PKC, respectivement (68).

De plus en plus d'évidences montrent que les voies de la MAPK ERK1/2 et de PI3 kinase/Akt sont activées par la ghreline via le GHS-R1a en situation de prolifération et de survie dans différents types cellulaires (section 1.5.4). Voici les caractéristiques de ces voies :

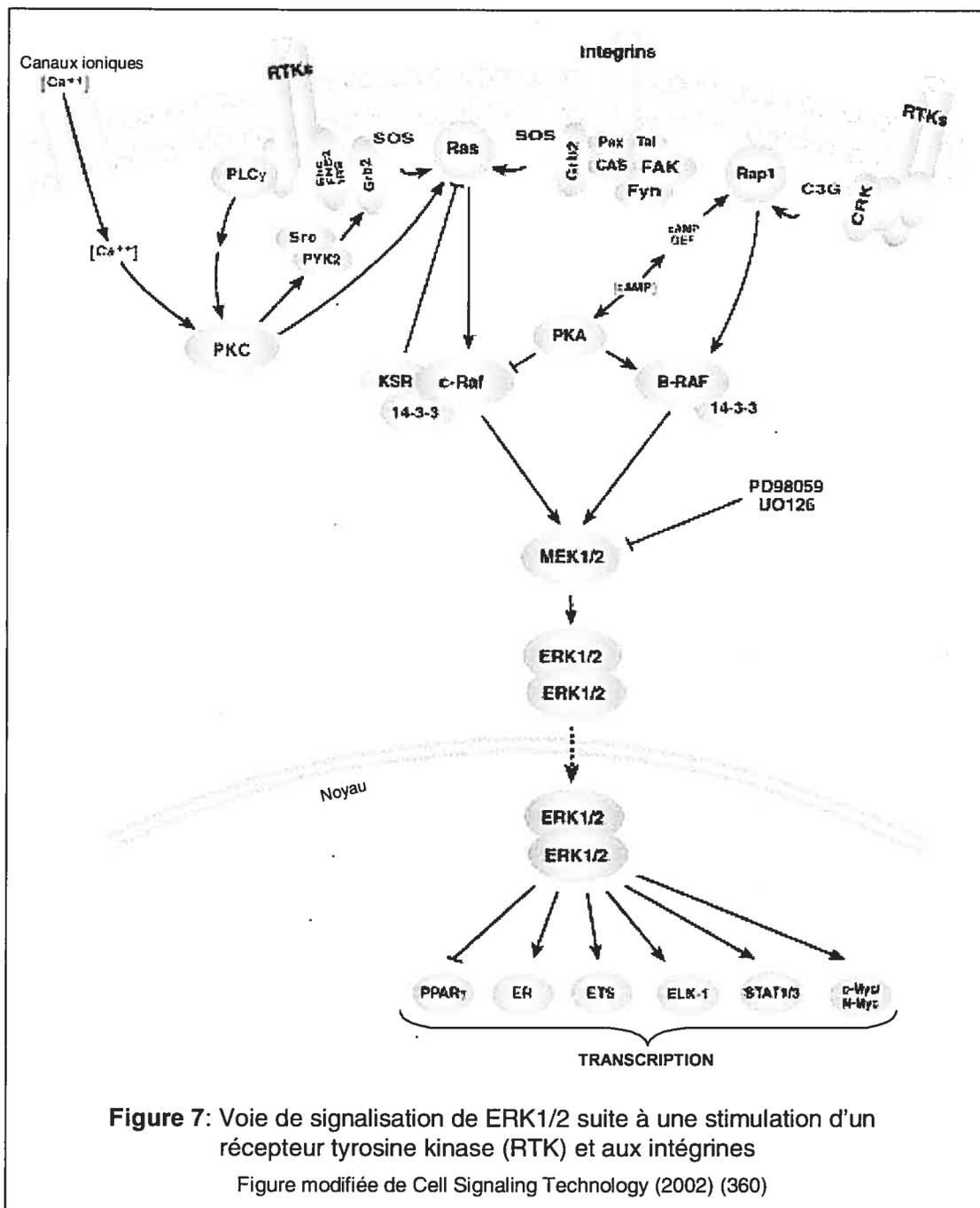
1.3.7.2 La voie de la MAPK ERK1/2

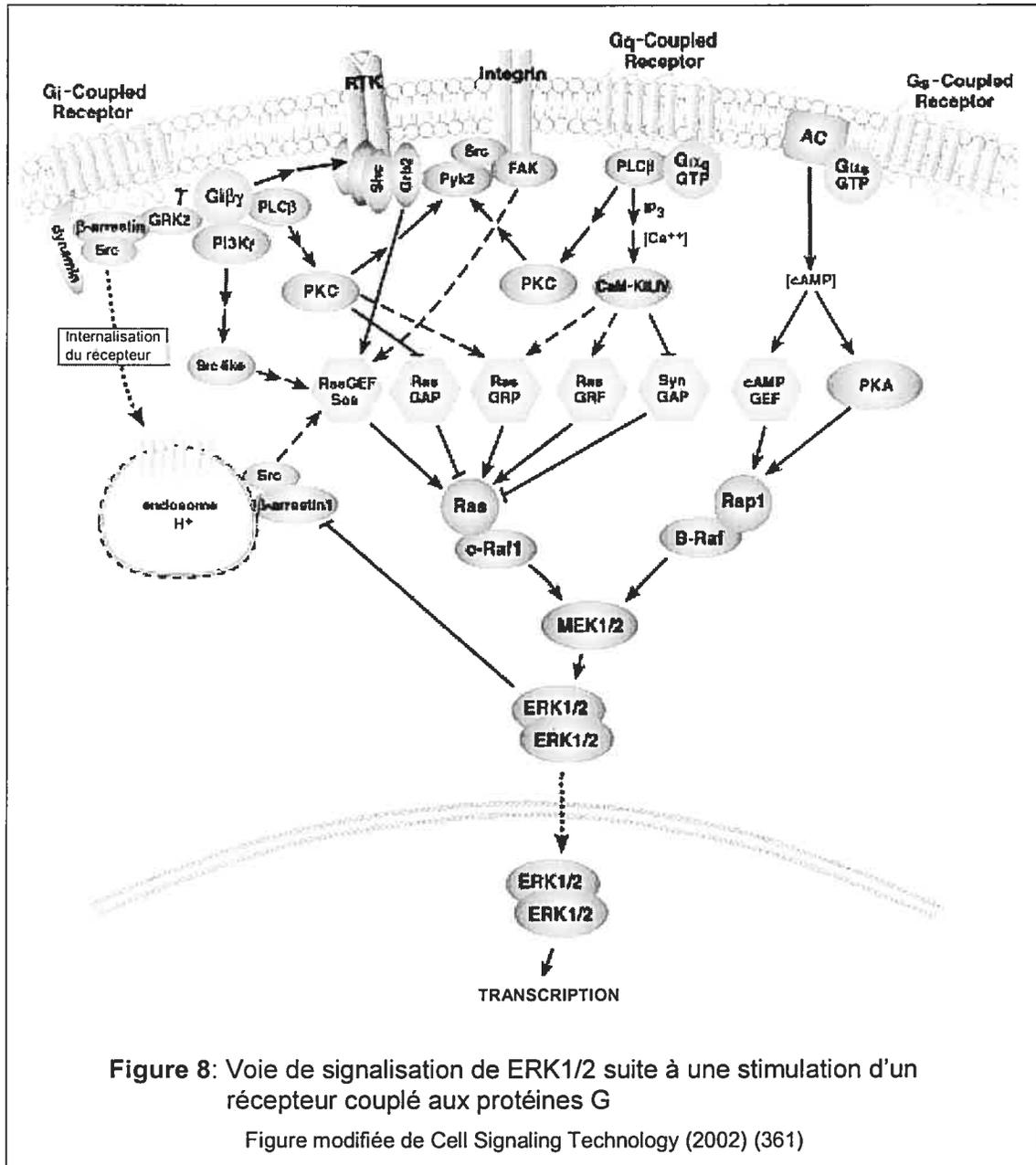
La voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase) est caractérisée par une cascade de phosphorylations successives entre trois catégories de protéines kinases, MAPK kinase kinase, MAPK kinase et MAPK, menant rapidement à une réponse cellulaire (Figure 6). Il y a principalement trois types de MAPK : ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) et p38, lesquels sont constitués de plusieurs isoformes. Alors que ERK 1 et 2 stimulent la croissance, la différenciation et la survie des cellules, JNK1/2 et p38 jouent un rôle dans les réponses du stress et inflammatoire.



La figure 6 montre des exemples de la cascade de phosphorylations qui a lieu dans les voies des MAPK pour aboutir à l'activation de la MAPK. Un stimulus extracellulaire active tout d'abord un récepteur situé à la membrane cellulaire. Plusieurs activateurs en aval du récepteur sont stimulés pour mener à la phosphorylation de la MAPK kinase kinase (MAPKKK), ce qui la rend active. Celle-ci phosphoryle une sérine et une thréonine de la MAPK kinase (MAPKK), qui à son tour active par phosphorylation (tyrosine et thréonine) la MAPK qui devient active. La MAPK, une sérine/thréonine kinase, est transloquée au noyau pour stimuler des facteurs de transcription spécifiques à chaque réponse cellulaire. Au cours de la cascade d'événements, une amplification du signal a lieu puisque chaque protéine successive dans la voie est plus abondante que son régulateur (en amont).

Parmi les trois principaux types de MAPK, seule la MAPK ERK semble être activée en réponse à la stimulation du GHS-R1a, un récepteur couplé à la protéine G_q . Plusieurs types de récepteurs peuvent activer la voie de ERK1/2 en réponse à une variété de signaux extracellulaires (facteurs de croissance, hormones et cytokines), dont les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) ou récepteurs des facteurs de croissance, aux intégrines et couplés aux protéines G. La figure 7 illustre les voies de signalisation menant à l'activation de ERK1/2 suite à la stimulation des récepteurs à activité tyrosine kinase et aux intégrines. Ces voies de signalisation convergent pour activer Raf, une MAPKKK, laquelle stimule MEK1/2 (MAPK kinase), qui à son tour phosphoryle ERK1/2. La figure 8, quant à elle, montre les voies de signalisation empruntées par les différents récepteurs couplés aux protéines G (G_i , G_q et G_s) pour activer ERK1/2. Les voies convergent également vers la stimulation de Raf, MEK1/2 et ERK1/2. Plusieurs interrelations existent entre les différentes voies qui mènent à l'activation de ERK1/2. (75-77)





1.3.7.3 La voie de PI3 kinase/Akt

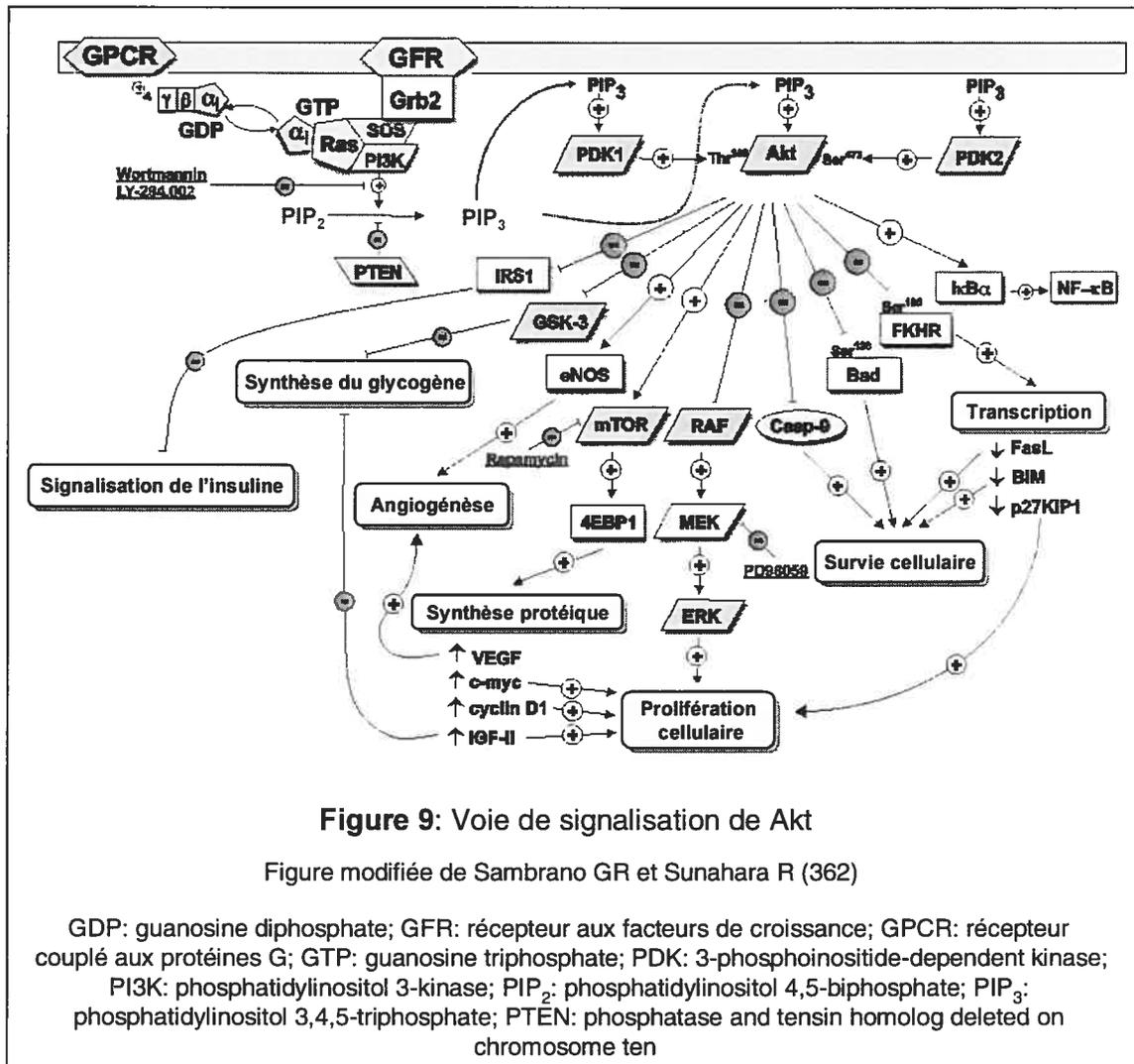
La voie de phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase)/Akt (Akt/PKB : protéine kinase B) joue plusieurs rôles dans la cellule, incluant la survie des cellules en les protégeant contre l'apoptose, la croissance, la prolifération et la

migration cellulaires. Cette voie est stimulée en réponse à différents stimuli extracellulaires, dont les facteurs de survie et de croissance (exemples : PDGF (platelet-derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), insuline), qui activent les récepteurs à activité tyrosine kinase ou couplés aux protéines G.

Le PI3 kinase, situé en amont de Akt, est un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique de 110 kDa (p110) et d'une molécule adaptatrice régulatrice de 85 kDa. Trois classes et sous-classes de PI3 kinase existent (IA, IB, II et III). Les sous-classes 1A et 1B sont activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase et couplés aux protéines G, respectivement. La classe I est celle qui catalyse la phosphorylation du groupement 3'-hydroxyl des phosphoinositides (PI). Une fois que les récepteurs sont stimulés, il y a recrutement à la membrane de PI3 kinase et ce dernier est activé. Par exemple, une liaison directe de la sous-unité p110 à la protéine Ras stimule l'activité de PI3 kinase et une fois activée, la kinase transforme le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃). La phosphatase PTEN est un régulateur négatif qui enlève le phosphate du groupement 3'-hydroxyl de PIP₃. PIP₃ active par la suite différentes protéines, dont PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase 1) et Akt.

Akt est une kinase sérine/thréonine, aussi appelée PKB (protéine kinase B), qui est constitué de trois membres : PKB α /Akt1, PKB β /Akt2 et PKB γ /Akt3. La voie de PI3 kinase est liée à Akt1. Une fois que PIP₃ est produit, Akt1 est recruté à la membrane et phosphorylé par PDK (une kinase sérine/thréonine) sur une thréonine (Thr308) et une sérine (Ser473). La phosphorylation de ces deux résidus permet à Akt d'avoir une activité totale. Plusieurs protéines peuvent alors interagir avec Akt, dont la majorité sont des substrats. La figure 9 illustre les différentes protéines que Akt stimule ou inhibe, menant à une réponse cellulaire spécifique. Par exemple, Akt stimule la survie cellulaire en

inhibant les protéines pro-apoptotiques Bad et caspase-9. La protéine Akt peut également inhiber la voie de ERK favorisant ainsi la prolifération cellulaire. L'activation de Akt peut aussi être indépendante de PI3 kinase, soit à travers PKA, mais le mécanisme n'est pas très bien connu. (78-80)



1.3.8 La désensibilisation du GHS-R1a

La désensibilisation d'un récepteur suite à une stimulation d'un ligand est très courante chez les récepteurs couplés aux protéines G. En effet, plusieurs études ont montré une rapide désensibilisation du récepteur des sécrétines de

l'hormone de croissance chez les cellules hypophysaires suite aux effets des GHS (81;82). La phosphorylation d'une sérine/thréonine sur le GHS-R est impliquée dans cette désensibilisation. La désensibilisation du récepteur est la résultante d'une internalisation de ce dernier via des vésicules tapissées de clathrines (81). Les cellules sont rapidement resensibilisées aux effets des GHS après seulement une heure de la première désensibilisation (81;82).

1.4 La ghreline

1.4.1 Le ligand naturel du GHS-R1a

Le récepteur des sécrétines de l'hormone de croissance a été pendant quelques années un récepteur orphelin, sans ligand endogène connu. Ce n'est seulement qu'en 1999, trois ans après la découverte du GHS-R1a, que l'équipe de Kojima et collaborateurs a identifié le peptide naturel de ce récepteur, qu'ils ont nommé ghreline (83). Le mot « ghreline » a été inspiré de « ghre » d'origine proto-indo-européenne qui signifie grandir (83). Étonnamment, la ghreline a été découvert au niveau de l'estomac.

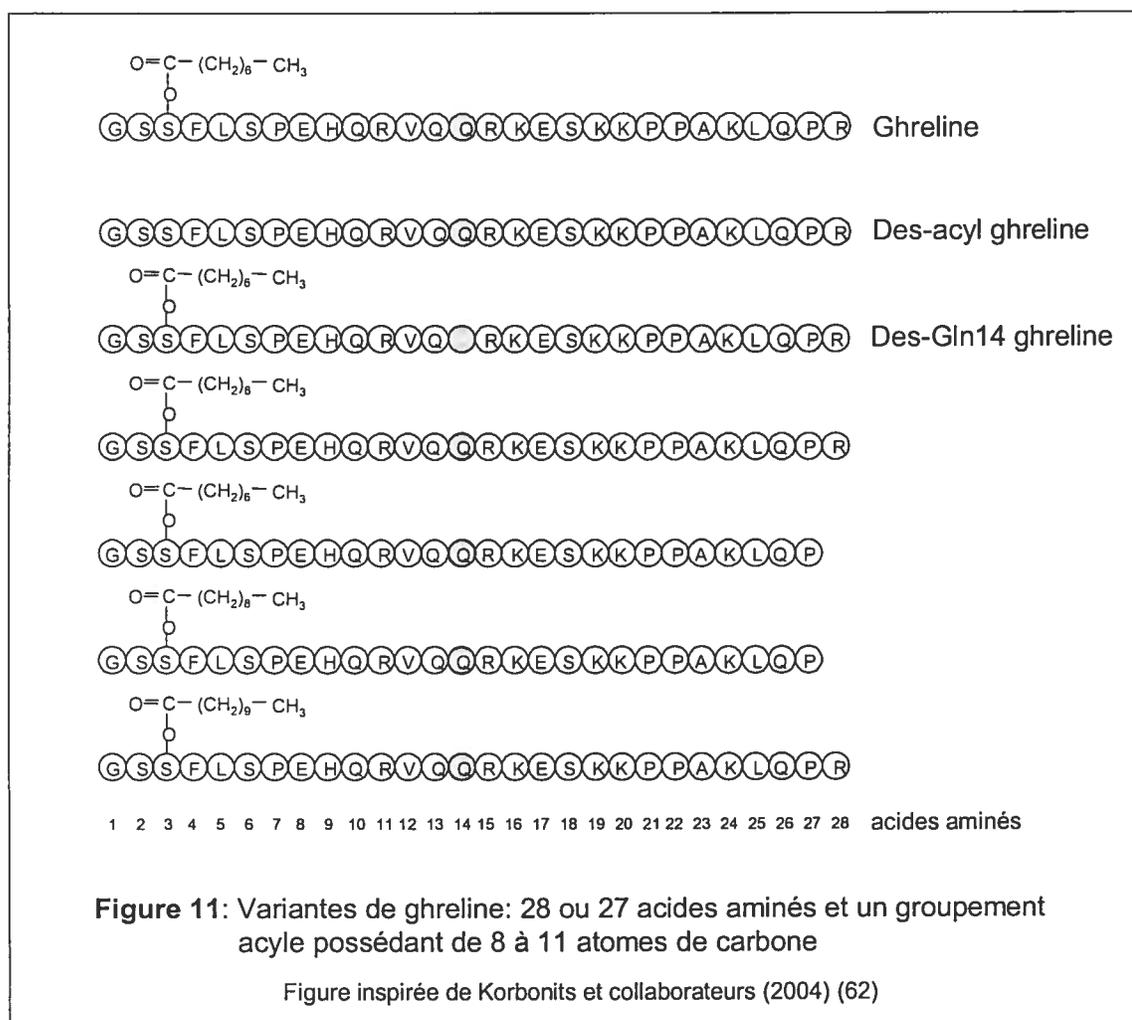
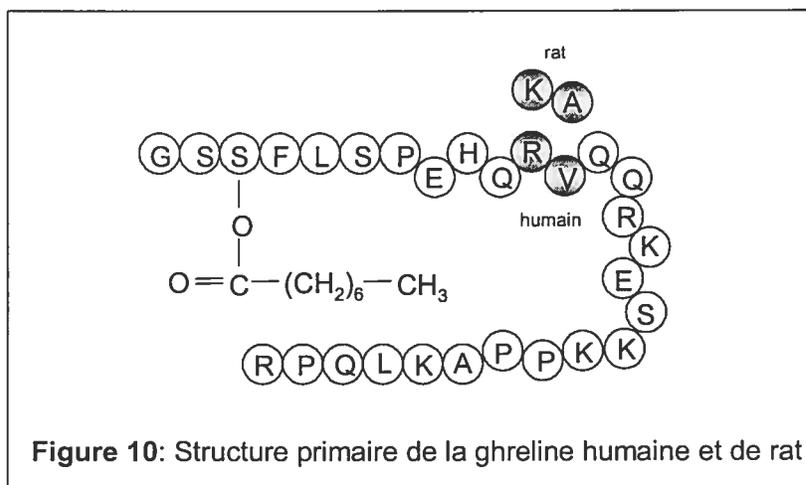
Il était clair que le GHS-R1a devait avoir son propre ligand naturel dans l'organisme. Pour découvrir ce nouveau ligand, Kojima et collaborateurs ont tout d'abord construit une lignée cellulaire stable CHO (Chinese hamster ovary) exprimant le GHS-R. Une variété d'extraits de tissus de rat a été ajoutée aux cellules en culture et les changements de calcium intracellulaire ont été mesurés par fluorescence pour chaque extrait tissulaire (cerveau, foie, cœur, rein, estomac et intestin). Le meilleur changement observé a été avec l'extrait d'estomac. La ghreline de rat a été purifiée de ces extraits par chromatographies successives et sa séquence a été déterminée. La séquence peptidique de la ghreline a été synthétisée et testée pour confirmer que cette série de 28 acides aminés était responsable de l'augmentation du calcium

intracellulaire et de la relâche de l'hormone de croissance dans des cellules hypophysaires primaires de rat. Cependant, aucune activité n'a été observée avec la séquence synthétisée. D'autres expériences ont permis d'identifier une modification post-traductionnelle sur le troisième acide aminé (sérine) de la ghreline. L'équipe de recherche a montré qu'un groupement n-octanoylé sur la sérine 3 est essentiel pour l'activité de la ghreline, autant pour l'augmentation du calcium intracellulaire que pour la sécrétion de la GH. (83)

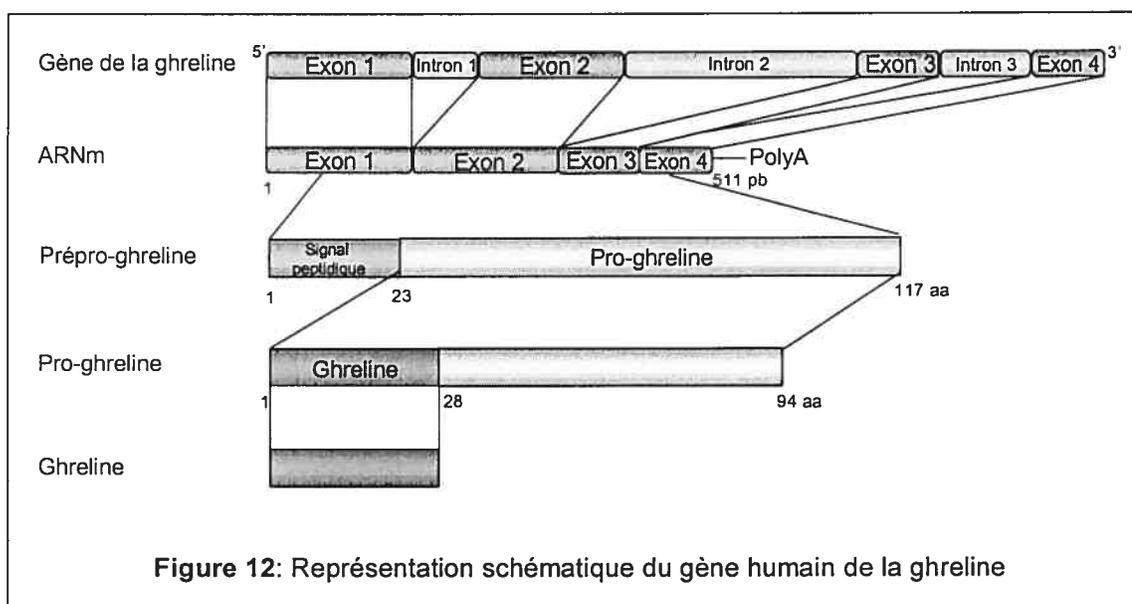
La ghreline humaine a aussi été purifiée et sa séquence ne diffère que de 2 acides aminés de celle de rat. La concentration plasmatique de la ghreline humaine est considérable avec $117,2 \pm 37,2$ fmol/mL (83). La ghreline, sécrétée par l'estomac, circule dans le sang pour agir au niveau de l'hypophyse. La découverte de la ghreline au niveau de l'estomac, sa capacité à circuler dans le sang et une distribution tissulaire périphérique de son récepteur suggéraient plusieurs perspectives intéressantes, dont des rôles potentiels de la ghreline dans de nombreux tissus périphériques.

1.4.2 Caractérisation de la ghreline

La ghreline découverte par Kojima et collaborateurs est un peptide de 28 acides aminés qui est octanoylé sur sa sérine en troisième position suite à une modification post-traductionnelle (Figure 10) (83). Dans l'organisme, cette modification sur un peptide est unique: elle est essentielle pour la fonction biologique de la ghreline (83). La forme non octanoylée existe également, la des-acyl ghreline (Figure 11). Cette forme de ghreline n'augmente pas la concentration intracellulaire de calcium et ne stimule pas la sécrétion de la GH, puisqu'elle est incapable de lier le GHS-R1a (84-86). La des-acyl ghreline est pourtant retrouvée en plus grande concentration dans la circulation sanguine (87). Depuis la découverte de la ghreline, aucune activité biologique n'avait été



observée pour la des-acyl ghreline. Cependant, de très récentes études ont démontré plusieurs rôles biologiques de cette forme de ghreline dans différents types cellulaires, qui seront discutés à la section 1.5.5. Plusieurs autres variantes de la ghreline existent suite à un épissage alternatif (Figure 11). La des-Gln14 ghreline ne possède que 27 acides aminés avec une glutamine manquante en position 14 (88). L'épissage qui a lieu dans ce cas-ci est unique, parce qu'il se produit dans l'exon, la portion codante de l'ADN du peptide. Des peptides analogues actifs de la ghreline sont caractérisés par un groupement acyle composé d'une chaîne de carbones de 10 ou 11 atomes au lieu de 8 et/ou par une séquence peptidique de 27 résidus dont le dernier acide aminé est manquant (arginine) (89).



Le gène de la ghreline humaine se situe sur le chromosome 3 (3p25-26). Il est composé de 4 exons et 3 introns, et il code pour un ADNc de 511 paires de base chez l'humain (Figure 12) (83;90). La protéine résultante de cet ADNc contient 117 acides aminés, contrairement à 28. Des analyses plus détaillées ont montré que la ghreline a un précurseur: la prépro-ghreline. La prépro-

ghrelina est caractérisée par un signal peptidique de 23 résidus en N-terminal et par une séquence de 94 résidus correspondant à la pro-ghrelina. Cette dernière possède la ghrelina mature de 28 acides aminés, qui commence à partir de la glycine 24 du précurseur, et une queue de 66 acides aminés (83). Les 4 ou 5 premiers acides aminés de la ghrelina, Gly-Ser-Ser(n-octanoylé)-Phe-Leu, sont suffisants pour l'activité de la ghrelina (84). Les deux derniers résidus du peptide, proline et arginine, sont des signaux d'épissage (83).

L'identité de séquence entre la protéine précurseur de rat et celle humaine est de 82,9%. Seulement deux résidus diffèrent entre les séquences de ghrelina de rat et humaine, ce qui suggère que ce peptide est hautement conservé entre les différentes espèces (83).

La région du promoteur en 5' de la ghrelina a été clonée et caractérisée par principalement deux équipes de recherche (91;92). Le promoteur de la ghrelina ne possède pas de boîtes typiques GC et CAAT, mais la séquence TATATAA est présente. L'activité de cette dernière est contradictoire dans les deux études : l'une indique que la boîte TATATAA n'est pas fonctionnelle (91) alors que l'autre montre qu'elle est active malgré des mutations (92). Plusieurs sites possibles de liaison ont été identifiés pour les facteurs de transcription AP-2, bHLH, PEA-3, Myb, NF-IL6, le facteur nucléaire 5 d'hépatocyte, NF- κ B (nuclear factor- κ B) et USF (91;92). Des demi-sites pour les éléments de réponse aux oestrogènes et aux glucocorticoïdes ont aussi été trouvés (91). De plus, il a été montré que le glucagon et son second messager AMPc augmentent l'activité du promoteur de la ghrelina dans des cellules gastriques humaines en culture (91;92). Cependant, le mécanisme d'action de l'AMPc est inconnu puisque aucun élément de réponse à l'AMPc ne semble pas présent dans le promoteur de la ghrelina (91). Finalement, il est à noter que l'activité du promoteur de la ghrelina est spécifique selon le type cellulaire (92).

De plus, il a été démontré que la ghreline plasmatique est associée à la lipoprotéine de haute densité (HDL) (93). Le HDL, quant à lui, est lié à la paraoxonase, une estérase calcium dépendant. Cette estérase a la fonction de briser les liens esters. Il a été montré dans les maladies coronariennes que l'activité de la paraoxonase est diminuée, suggérant que cette enzyme pourrait avoir des effets protecteurs (94). Puisqu'un lien ester relie le groupement octanoylé à la ghreline, la liaison du peptide à une estérase suggère un mécanisme possible dans la conversion de la ghreline en des-acyl ghreline (93).

1.4.3 Distribution tissulaire de la ghreline

Des études de distribution tissulaire par RT-PCR ont permis d'évaluer l'importance de l'expression de la ghreline au niveau de tout l'organisme (voir Tableau II). Il a été montré que la ghreline est principalement exprimée au niveau de l'estomac et de plusieurs parties de l'intestin (19;87;95;96). De plus, Gnanapavan et collaborateurs ont montré qu'elle est exprimée à différents niveaux dans les tissus suivants (de la plus forte à la plus faible expression): les poumons, le pancréas, les veines, les ganglions lymphatiques, le colon, l'hypophyse, les seins, le rein, les ovaires, la prostate, le foie, la rate, les lymphocytes, les testicules, le tissu adipeux, le placenta, la glande surrénale, le muscle, la thyroïde, le myocarde et la peau (19). Une expression de la ghreline est aussi observée dans différents noyaux de l'hypothalamus (ARC, VMN, DMN, PVN) (23), dans l'aorte (26), les cardiomyocytes (27), les ostéoblastes (30) et dans plusieurs types de tumeurs (35;39;46-48;51;97;98). La ghreline montre une plus vaste expression périphérique que le GHS-R1a. Le manque d'expression détectable du GHS-R1a dans les différents tissus périphériques étudiés suggère que la ghreline pourrait agir également sur un autre sous-type de GHS-R, encore inconnu (19).

1.4.4 Sécrétion et régulation de la sécrétion de la ghreline

La sécrétion de la ghreline a lieu surtout au niveau de l'estomac. Les cellules endocrines du tractus gastro-intestinal sont les principales sources de ghreline (95;99). En effet, des cellules responsables de la sécrétion de la ghreline ont été identifiées. Auparavant, ces cellules étaient appelées « X/A-like », mais leur nom a changé pour « cellules à ghreline » ou « cellules Gr ». Ce type cellulaire représente une large proportion de la population de cellules localisée dans le « mucoso » gastrique (environ 20%) (99). De plus récentes études ont rapporté que la ghreline était sécrétée par d'autres types cellulaires, dont les cardiomyocytes (27) et les chondrocytes (100).

La régulation de la ghreline a lieu à différents niveaux, tels que la transcription du gène et la traduction de l'ARN messager, la modification post-traductionnelle, le taux de sécrétion. Plusieurs molécules ou conditions influencent la régulation de la ghreline. Le jeun, la leptine, la GHRH et la testostérone régulent de façon positive la ghreline alors qu'une régulation négative du peptide est observée par l'alimentation, la GH, le glucose, l'insuline, la somatostatine et les hormones thyroïdiennes.

Les taux sanguins de ghreline varient beaucoup durant une journée en fonction de l'alimentation et de la période de la journée. De nombreuses études réalisées sur cette régulation sont rapportées dans la littérature. La concentration de ghreline circulante augmente lors d'un jeun et diminue après un repas (95;101-103). Chez des animaux à jeun, il a été montré que les niveaux sériques de ghreline sont diminués suite au remplissage de l'estomac avec une solution de glucose, mais cet effet n'est pas observé avec un même volume d'eau. Cette observation suggère que ce n'est pas une expansion physique de l'estomac qui réduit le taux circulant de ghreline (101;104). Une étude réalisée chez le rat a démontré que la diminution du niveau de ghreline

suite à un repas nécessite une stimulation post-gastrique. Dans cette étude, les niveaux plasmatiques de ghreline ne sont pas affectés par une infusion intragastrique d'une solution de glucose ou d'eau lorsque la vidange gastrique est bloquée (104). Une plus récente étude chez l'humain a rapporté qu'une exposition des aliments au petit intestin est suffisante pour supprimer le taux de ghreline, contrairement à l'exposition des nutriments à l'estomac, qui n'est pas nécessaire (105). De plus, une micro-injection de la ghreline dans l'ARC (hypothalamus) démontre que la ghreline stimule la prise de nourriture de façon dose dépendante, suggérant que ce peptide joue un rôle majeur dans le contrôle de la prise de nourriture (106). Une variation diurne de la ghreline est également observée : le niveau de ghreline est élevé durant la nuit jusqu'à 1 h du matin, où il chute pour le reste de la nuit jusqu'à 9 h du matin (102;107). Les niveaux élevés de ghreline avant la prise de nourriture et durant la nuit ainsi que les taux diminués immédiatement après un repas suggèrent que la ghreline jouerait un rôle important dans l'initiation d'un repas (102). Plus récemment, il a été rapporté que les niveaux de des-acyl ghreline sont également diminués après une prise de nourriture (108). De plus, de nombreuses études démontrent que les concentrations de ghreline sont aussi affectées par l'obésité et l'anorexie. En effet, le taux circulant de ghreline est plus bas et plus élevé chez les patients obèses et anorexiques respectivement (109;110). Ce sujet est discuté plus en détail à la section 1.5.6. Finalement, l'âge influence les niveaux de l'ARNm et plasmatiques de la ghreline : une diminution de la ghreline est observée chez des rats plus âgés (111).

Le rôle de la leptine sur la régulation de la ghreline n'est pas encore très bien établi, puisque des effets contraires sont observés. Il a été rapporté qu'une administration de leptine chez le rat stimule l'expression de l'ARNm de la ghreline au niveau de l'estomac (112). Des souris déficientes en leptine ou en récepteur de la leptine montrent des niveaux d'expression de la ghreline diminués comparativement au contrôle (112;113). Cependant, une

administration de leptine à une dose physiologique ne régule pas la ghreline chez des sujets sains (114).

Il a été démontré que la GHRH stimule l'expression du messenger de la ghreline dans l'hypophyse de rat, mais l'administration d'antagonistes de la GHRH chez des sujets sains inhibe les niveaux de l'hormone de croissance sans affecter ceux de la ghreline circulante (115;116).

Les effets de la GH sur l'expression et la sécrétion de la ghreline sont controversés. Tout d'abord, des études ont montré qu'une administration de GH ne modifie pas les niveaux circulants de ghreline (117;118). Cependant, d'autres études rapportent qu'une administration de la GH chez le rat inhibe l'expression et le taux plasmatique de ghreline (111;119). Finalement, chez des rats et patients déficients en GH, les résultats suggèrent une réduction de l'expression gastrique et des niveaux circulants de ghreline (120;121). Les différents effets de la GH sur la composition du corps, la distribution des graisses et la résistance à l'insuline pourraient masquer les effets de la GH sur la régulation de la ghreline (62).

Des études chez l'humain ont rapporté que l'hyperglycémie induite par une administration orale ou intraveineuse d'une solution de glucose réduit significativement le taux circulant de ghreline et il est rétabli 30 minutes (min) après le retour à la normal du glucose sanguin (122-124). Cet effet serait indépendant de l'insuline (123). Par contre, il a été démontré que l'insuline pourrait aussi jouer un rôle dans la régulation négative des niveaux de ghreline (124-126). En situation d'hyperinsulinémie chez le rat et chez l'humain, les concentrations plasmatiques de ghreline sont diminuées (124;125;127). Cependant, ce ne sont pas toutes les études qui démontrent une inhibition du taux de ghreline en présence d'insuline (112;124).

Finalement, une déficience en testostérone induit une réduction du taux de ghreline, mais il est revient à la normal suite à un traitement à la testostérone (128). La somatostatine inhibe également la sécrétion de la ghreline chez des sujets normaux (116;129) et une déficience en hormones thyroïdiennes augmente l'expression gastrique et les niveaux circulants de ghreline, lesquels sont diminués en situation d'hyperthyroïdisme (120;130).

Plusieurs études montrent des effets contraires d'une même molécule sur la régulation de l'expression et de la sécrétion de la ghreline. Ces contradictions peuvent être dues à l'utilisation d'espèces différentes, comme l'humain et les rongeurs. La différence dans la régulation hormonale chez ces deux espèces peut compliquer l'analyse des résultats (62). Plus d'études devront être réalisées afin de démythifier ces contradictions et de mieux comprendre la régulation complexe de la ghreline chez l'humain.

1.5 Activités biologiques de la ghreline et de son récepteur

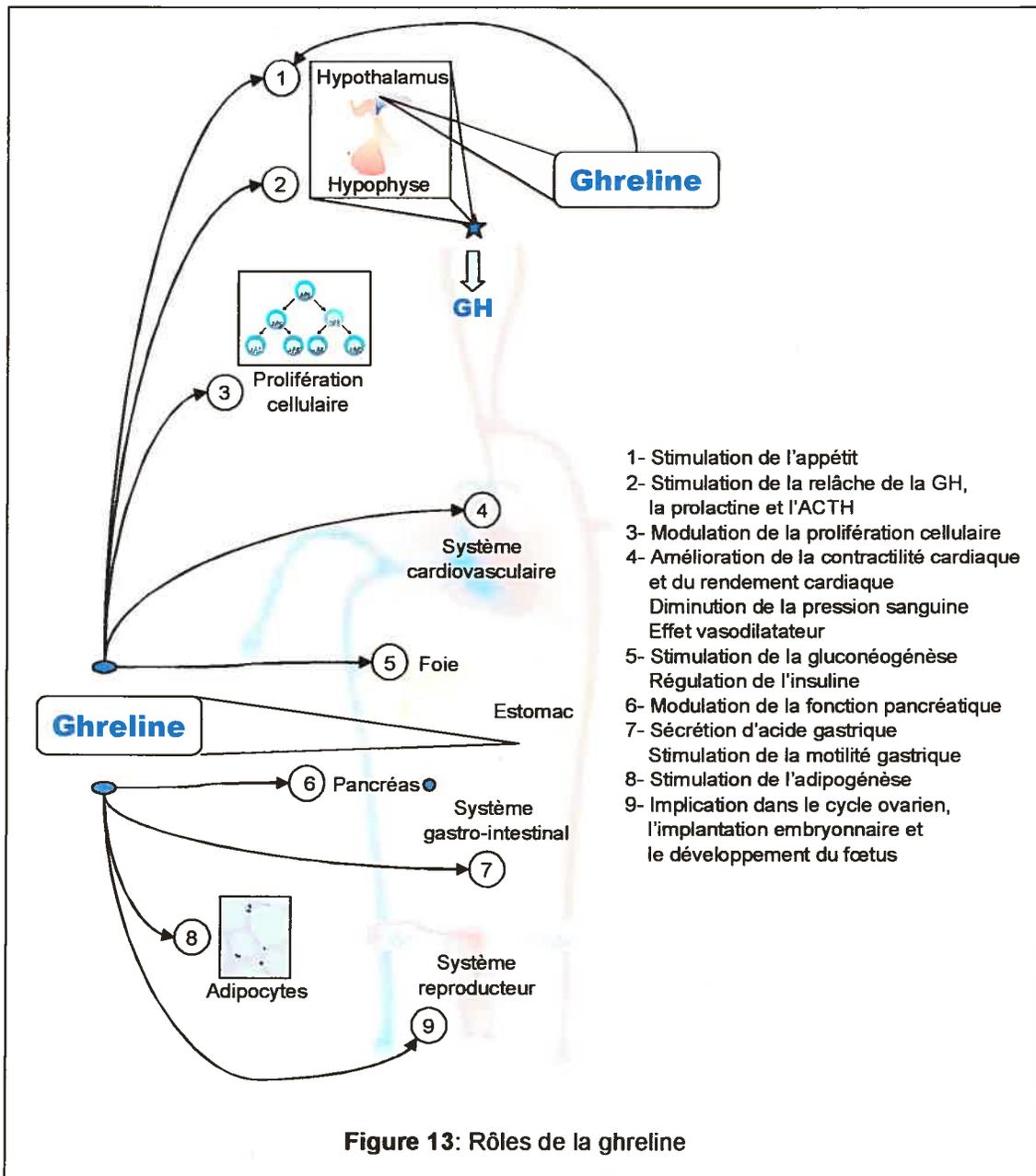
1.5.1 La relâche de l'hormone de croissance

Le premier rôle établi de la ghreline a été celui de la relâche de l'hormone de croissance grâce à la découverte du GHS-R1a. La ghreline et les GHS synthétiques stimulent la relâche de la GH de façon dose dépendante dans l'hypophyse et l'hypothalamus (Figure 13) (83;131-135). La première étude a montré que la ghreline active directement et spécifiquement le GHS-R1a dans des cellules hypophysaires en culture de rat, menant à la sécrétion de la GH (83). L'action de la ghreline sur la relâche de la GH a lieu autant dans des études *in vitro* qu'*in vivo* (humains et rats), mais l'effet sur la GH serait plus puissant dans des études *in vivo* (83). Cette observation suggère l'implication d'autres facteurs dans la relâche *in vivo* de la GH induite par la ghreline. Effectivement, il est rapporté qu'une coadministration de la ghreline ou des

GHS avec la GHRH provoque un effet synergique sur la relâche de la GH chez l'humain, même à faible dose de ghrelina (74;131;136-141). L'utilisation d'un antagoniste de la GHRH chez l'humain et d'un sérum anti-GHRH chez le rat confirme l'effet de la GHRH sur la sécrétion de la GH médiée par la ghrelina (138;140). Il est à préciser qu'une administration de la ghrelina stimule la sécrétion de la GH de façon plus importante qu'une dose équivalente de GHS (131). De plus, des études ont montré que la ghrelina augmente significativement la relâche de la GHRH (137;142) alors qu'une sécrétion de la GHRH n'est pas détectée en réponse aux GHS chez le rat (143). Le mécanisme exact de l'effet de la ghrelina sur la sécrétion de la GH devra être clarifié.

1.5.2 Effets périphériques de la ghrelina

L'expression périphérique du GHS-R1a suggérait fortement des actions au niveau des différents tissus. Depuis sa découverte, de nombreux rôles de la ghrelina ont été trouvés en périphérie. Certains de ses effets peuvent être indirects en passant par les hormones hypophysaires ou hypothalamiques alors que d'autres, semblent être directs. Selon l'origine de la sécrétion de la ghrelina, les actions de ce GHS peuvent être endocrines, paracrines ou autocrines. Il a donc été démontré que la ghrelina joue un rôle dans l'alimentation, la sécrétion et la motilité gastriques, la fonction pancréatique, la sécrétion de l'insuline, le métabolisme du glucose, l'adipogénèse, la sécrétion de certaines hormones endocriniennes et la reproduction. Il a aussi été rapporté que la ghrelina a des effets cardiovasculaires et peut moduler la prolifération et la survie de certains types cellulaires (Figure 13).



Avant même la découverte de la ghreline, plusieurs études ont montré que les GHS avaient la capacité d'influencer la faim indépendamment de la relâche de la GH chez le rat (144;145). Une première étude avec la ghreline a montré une augmentation du poids chez des souris normales et des rats déficients en GH après un traitement sous-cutané de deux ou une semaines

respectivement à la ghreline, en réduisant l'utilisation des graisses (101). Par la suite, d'autres études ont confirmé ces observations (146-148). L'ARC de l'hypothalamus est un site d'action de la ghreline. Plusieurs équipes ont testé l'effet d'une injection de la ghreline au niveau du 3^e ventricule ou directement dans l'ARC. Une augmentation de la faim ou de la prise de nourriture a été observée de façon dose dépendante à la concentration injectée de ghreline et est bloquée par un prétraitement avec un anticorps contre la ghreline (101;106;149). La leptine et les peptides NPY (neuropeptide Y) et AgRP (agouti-related protein) ont aussi comme cible l'ARC pour influencer l'appétit. La leptine est une hormone produite par le tissu adipeux qui supprime l'appétit, alors que les peptides NPY et AgRP sont produits par les neurones de l'ARC et stimulent l'appétit (150;151). La ghreline est la première hormone circulante qui stimule la prise de nourriture après une injection systémique. En effet, même une injection périphérique de la ghreline induit la stimulation de la prise de nourriture (101;152;153). Le nerf vagal semble jouer un rôle dans l'appétit médié par la ghreline. Il a été montré que le GHS-R1a est exprimé dans le neurone afférent vagal et présent dans les terminaisons afférentes. Un blocage du neurone afférent vagal inhibe l'appétit induite par la ghreline (152). Trois mécanismes ont été suggérés pour l'action de la ghreline sur la prise de nourriture (62): 1) La ghreline synthétisée dans l'estomac atteint l'ARC via la circulation sanguine et en traversant la barrière hémato-encéphalique (83;154); 2) La ghreline synthétisée en périphérie stimule le nerf afférent vagal, lequel exprime le GHS-R1a. Le nerf vagal est relié au noyau du tractus solitaire dans le bulbe rachidien, lequel est relié à l'hypothalamus (152); 3) La ghreline est synthétisée localement dans l'hypothalamus et interagit directement avec les neurones NPY/AgRP (23). Récemment, un nouveau mécanisme de la régulation de l'appétit a été suggéré dans les cellules hypothalamiques, impliquant l'AMPK (155). L'AMPK (AMP-activated protein kinase) maintient un niveau d'énergie approprié dans la cellule. Il a été montré qu'une administration *in vivo* de la ghreline stimule l'activité de l'AMPK dans

l'hypothalamus, menant à une augmentation de la prise de nourriture (156). Contrairement à la ghreline, la leptine inhibe l'activité de l'AMPK, menant à une réduction de la prise de nourriture (156). Cette nouvelle voie pourrait être une cible thérapeutique dans le traitement de l'obésité.

La ghreline a été découverte au niveau de l'estomac. Il semblait évident que ce peptide jouait un rôle à ce niveau. En effet, il a été rapporté qu'une administration intraveineuse de la ghreline augmente de façon dose dépendante la sécrétion d'acide gastrique et la motilité gastrique chez le rat (147;157). Cet effet est aussi observé par une administration intracérébroventriculaire de la ghreline (158). L'action de la ghreline sur la fonction gastro-intestinale peut être inhibée par une vagotomie cervicale, suggérant l'implication du nerf vagal dans le mécanisme d'action de la ghreline sur le tractus gastro-intestinal (157;158). De plus, un rôle de la ghreline a été observé dans la modulation de la fonction pancréatique, dans lequel la ghreline et le GHS-R1a sont exprimés (17;19). Il a été rapporté que la ghreline inhibe la sécrétion exocrine pancréatique chez le rat et dans des cellules pancréatiques isolées du rat (159). Chez l'humain, la ghreline semble augmenter les niveaux de somatostatine et du polypeptide pancréatique alors qu'aucun effet n'est observé sur la gastrine (160).

Plusieurs études ont montré un rôle de la ghreline dans la régulation de l'insuline. Par contre, les différents résultats observés sont controversés. Chez l'humain de poids normal et obèse, la ghreline inhibe la sécrétion de l'insuline après une injection intraveineuse, malgré une augmentation du taux de glucose (161;162). Des résultats semblables ont été observés dans le pancréas isolé de rat (163) et dans les cellules isolées des îlots pancréatiques de rat (164) et de souris (165). D'autres études montrent cependant un effet stimulateur de la ghreline sur l'insuline. Chez le rat normal et diabétique, une administration de la ghreline stimule la sécrétion de l'insuline par le pancréas (96;166;167).

D'éventuelles études devront être réalisées pour mieux comprendre l'effet de la ghreline sur la sécrétion de l'insuline. La gluconéogénèse est un phénomène qui permet la synthèse du glucose à partir de précurseurs non glucidiques. La phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) est une enzyme limitante de la gluconéogénèse qui est inhibée par l'insuline et cet effet est inversé par la ghreline (52). La ghreline joue donc un rôle positif dans la régulation de la gluconéogénèse. Cependant, le GHS-R1a ne semble pas être exprimé dans le foie (19), ce qui suggère que l'action de la ghreline passerait par un récepteur distinct du GHS-R1a. Il a aussi été rapporté que la ghreline stimule l'IRS-1 (insulin receptor substrate), le substrat du récepteur à l'insuline, ainsi que les molécules de signalisation en aval, GRB2 (growth factor receptor binding protein 2) et MAPK, dans des cellules d'hépatomes humains (52). De plus, la ghreline semble augmenter les niveaux de glucose. En effet, il a été rapporté qu'une injection intraveineuse de la ghreline augmente le taux plasmatique de glucose chez des patients avec un poids normal ou obèses (161;162). Cependant, ce n'est pas clair si l'effet observé sur le glucose est dû à une diminution de la sécrétion de l'insuline (161).

Quelques études ont montré un effet de la ghreline au niveau du tissu adipeux. Il a été montré en effet que la ghreline stimule l'adipogénèse et inhibe la lipolyse stimulée par l'isoprotérénol dans des études *in vitro* et *in vivo* chez le rat (40;168;169). La première étude sur le sujet a rapporté qu'une administration périphérique quotidienne de la ghreline chez les rongeurs provoque un gain de poids en réduisant l'utilisation des graisses (101). Cependant, une étude publiée quelques années plus tard a révélé que l'augmentation du contenu en gras corporel induite par la ghreline serait indépendante de l'effet de la ghreline sur l'appétit et sur le gain de poids (170). Le mécanisme par lequel la ghreline jouerait ce rôle est controversé. Des rats transgéniques, dont l'expression du GHS-R1a est diminuée dans l'ARC, montrent une réduction de leurs tissus adipeux comparativement aux rats

contrôles (171). L'expression de l'ARNm du GHS-R1a est augmentée significativement durant la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes *in vitro* (40). Ces deux études suggèrent donc l'implication du GHS-R1a dans l'adiposité. Cependant, deux autres études ont plutôt montré l'implication d'un récepteur distinct du GHS-R1a. En effet, il a été rapporté que la ghreline stimule l'adipogénèse *in vivo* chez le rat indépendamment du GHS-R1a, puisque la des-acyl ghreline a le même effet (168). Dans ce même ordre d'idées, l'effet inhibiteur de la ghreline sur la lipolyse serait aussi observé par un traitement à la des-acyl ghreline dans des adipocytes de rat, suggérant un mécanisme indépendant du GHS-R1a (169). De plus, une augmentation de l'expression de PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) a été observée suite à la différenciation des adipocytes de rat induite par la ghreline (40). PPAR γ , un récepteur nucléaire, est important dans le processus d'adipogénèse, puisqu'il régule plusieurs voies transcriptionnelles impliquées dans ce processus (172). Finalement, un traitement à la ghreline sur des adipocytes en culture inhibe l'expression de l'adiponectine, peptide impliqué dans la pathogénèse de la résistance à l'insuline et l'obésité (173). Ces résultats suggèrent que la ghreline joue un rôle dans le processus de l'adipogénèse et l'entreposage de l'énergie via un mécanisme encore incertain.

Outre la GH, la ghreline semble activer la sécrétion de plusieurs hormones endocriniennes. Une étude chez des sujets normaux a montré qu'une administration intraveineuse de ghreline augmente significative la sécrétion de la prolactine (stimule la lactation) et de l'ACTH (hormone adrénocorticotropique; stimule la sécrétion des glucocorticoïdes, des minéralocorticoïdes et des stéroïdes du cortex surrénalien), suivie d'une augmentation conséquente des niveaux de cortisol (131;132). La ghreline ne semble avoir d'effet sur la sécrétion de la FSH (follicle stimulating hormone), la LH (luteinizing hormone) et la TSH (thyroid-stimulating hormone) suite à une injection intraveineuse du peptide chez le rat et l'humain (83;132). Par contre,

deux études ont montré une inhibition des niveaux de la TSH et de la LH suite à l'administration intracérébroventriculaire de la ghreline chez le rat (149;174).

La ghreline aurait également un rôle à jouer dans la reproduction. Tout d'abord, une expression cyclique de la ghreline est observée dans les ovaires de rat, où les niveaux d'expression sont plus élevés durant les stades précoces de la gestation et plus faibles lors de la phase tardive (175). Cette expression est bloquée par un antagoniste des GnRH (gonadotropin-releasing hormone), qui régulent la sécrétion de la LH et la FSH. Le récepteur de la ghreline est aussi exprimé dans les ovaires humains (33). Le placenta humain et de rat exprime et synthétise la ghreline et un pic d'expression au 16^e jour de la gestation est observé (176). Ce résultat suggère que la ghreline pourrait influencer la croissance du fœtus. Une expression variée du peptide et du GHS-R1a est aussi observée dans l'endomètre, dont l'expression du peptide est dramatiquement augmentée lors d'une gestation, suggérant un rôle de la ghreline dans l'implantation embryonnaire (177). La ghreline serait en plus impliquée dans le développement néonatal, puisqu'une administration sous-cutanée de la ghreline du jour 15 à 21 aux rates en gestation provoque une augmentation du poids corporel des nouveaux-nés (178). La ghreline aurait également un rôle à jouer dans le système reproducteur mâle, car la ghreline et le GHS-R1a sont exprimés dans les testicules de rat, dont les cellules matures de Leydig (37;179). Il a été montré que la ghreline inhibe la sécrétion de la testostérone *in vitro* et module la prolifération des cellules Leydig (180). Ces résultats suggèrent que la ghreline agit à différents niveaux sur le système reproducteur femelle et mâle. Étant donné que le système reproducteur est grandement dépendant du statut nutritionnel, la ghreline pourrait agir au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (175).

1.5.3 Effets cardiovasculaires de la ghreline

Il est connu que la GH joue un rôle cardioprotecteur dans les maladies du coeur, telle la cardiomyopathie (181). Cependant, les effets bénéfiques observés des GHS sur la fonction cardiaque sont indépendants de la relâche de la GH. Ceci a été démontré dans des études impliquant des patients déficients en GH et des rats hypophysectomisés après l'administration de GHS (182-186). L'expression du GHS-R1a dans le système cardiovasculaire est une autre évidence que l'action des GHS et de la ghreline peut être directe, indépendamment de la sécrétion de la GH, autant chez les animaux que chez l'humain (19;27).

Les effets des GHS au niveau du cœur ont tout d'abord été découverts par des études impliquant les GHS synthétiques. Ils jouent plusieurs rôles dans l'amélioration de la fonction du système cardiovasculaire. Par exemple, l'hexaréline, un puissant GHS, protège le cœur contre les dommages causés par une dysfonction ventriculaire post-ischémique chez le rat (186), améliore les performances cardiaques du rat après un infarctus du myocarde (187) et augmente la fraction éjectée du ventricule gauche chez des patients normaux et souffrant d'une cardiomyopathie ischémique (188;189).

Un rôle potentiel de la ghreline était envisageable dans le système cardiovasculaire dû à l'expression du GHS-R1a dans le cœur, l'aorte et les cardiomyocytes (19;25;27). Des sites de liaison spécifique de la ghreline ont été identifiés dans les tissus cardiovasculaires, incluant le cœur, l'aorte, les artères périphériques et les veines (42). Récemment, il a aussi été montré que la ghreline est synthétisée et sécrétée par les cardiomyocytes, agissant probablement par un mécanisme paracrine/autocrine (27). En effet, plusieurs études ont démontré un rôle de la ghreline dans le système cardiovasculaire. Des rats atteints d'une défaillance cardiaque et traités à la ghreline ont montré

une amélioration de la dysfonction du ventricule gauche, une diminution du remodelage ventriculaire et une amélioration de la performance cardiaque (190;191). Une administration intraveineuse de la ghreline diminue significativement la pression sanguine et augmente le rendement cardiaque, sans affecter le rythme cardiaque chez des volontaires sains et atteints d'une défaillance cardiaque chronique (25;192). Il a aussi été montré qu'une injection sous-cutanée de la ghreline à des personnes volontaires saines n'altère pas le rythme cardiaque ni la pression sanguine, mais une hausse significative de la fraction éjectée du ventricule gauche est observée après 30 min (193). Une autre étude a rapporté que la ghreline pouvait améliorer la contractilité cardiaque chez des rats déficients en GH (194). De plus, la ghreline a plusieurs effets vasodilatateurs et inhibe l'apoptose dans les cardiomyocytes et les cellules endothéliales, des sujets qui sont discutés respectivement aux sections 1.6.2 et 1.5.4.

La ghreline ne semble pas partager les mêmes effets cardioprotecteurs que les GHS synthétiques. Contrairement aux GHS synthétiques, la ghreline joue un faible rôle dans la protection du cœur contre une ischémie chez le rat (195), suggérant la présence d'un site spécifique aux GHS synthétiques dans le système cardiovasculaire (32;196). En effet, une liaison spécifique du [¹²⁵I]Tyr-Ala-hexaréline a été détectée dans le cœur, laquelle peut être inhibée par le Tyr-Ala-hexaréline non marqué, l'hexaréline et d'autres GHS peptidiques. Par contre, le MK-0677 et la ghreline sont incapables de déplacer la liaison du [¹²⁵I]Tyr-Ala-hexaréline, ce qui suggère la présence d'un autre type de GHS-R, ne liant pas la ghreline (32;197). Ce récepteur a été identifié comme étant le CD36, un récepteur à multiligands qui est impliqué dans le métabolisme des lipides (197;198).

1.5.4 Effets de la ghreline sur la prolifération et la survie cellulaires

En plus des nombreux rôles que joue la ghreline, plusieurs études ont récemment rapporté une action du peptide sur la prolifération et la survie cellulaires (Tableau III). Des effets contraires de la ghreline seraient observés dans la prolifération selon le type cellulaire étudié. La ghreline aurait des effets anti-prolifératifs sur la glande thyroïde et sur des lignées cellulaires mammaires (50;98). Cependant, plusieurs autres études suggèrent plutôt une prolifération cellulaire positive par la ghreline au niveau des cellules de la zone glomérulée (ZG) du cortex surrénalien, des cellules pancréatiques, des cardiomyocytes, des adipocytes, de la prostate, des hépatomes, de l'hypophyse et des ostéoblastes (29;30;35;41;48;49;52;199-201). Par quel mécanisme moléculaire la ghreline stimule-t-elle la prolifération de ces différents types cellulaires?

Seulement quelques équipes ont étudié les voies de signalisation impliquées dans la prolifération induite par la ghreline. Une première étude réalisée avec une lignée cellulaire d'adénocarcinomes pancréatiques a montré une augmentation de la prolifération cellulaire et de la phosphorylation de Akt médiée par la ghreline, dont les effets sont inhibés par l'utilisation d'un antagoniste du GHS-R1a (D-Lys-GHRP6) et d'un inhibiteur de PI3 kinase (Wortmannin) (49). Ces résultats suggèrent que la ghreline stimule la prolifération des cellules d'adénocarcinomes pancréatiques via l'activation du GHS-R1a suivie de l'activation de la voie PI3 kinase/Akt (49). Une seconde étude a rapporté que la ghreline augmente la prolifération des cellules en culture du cortex surrénalien (ZG) par un mécanisme impliquant le GHS-R1a et les voies des tyrosine kinases et des MAPK (199;202). La prolifération des cellules hypophysaires en culture (GH3) stimulée par la ghreline a été testée par une incorporation à la ^3H -thymidine (48). Dans ce type cellulaire, la ghreline augmente significativement l'incorporation à la ^3H -thymidine via la phosphorylation de la MAPK ERK1/2, lesquelles sont inhibées par des

inhibiteurs de la MAPK kinase (MEK), de la PKC et de la tyrosine kinase. Des effets semblables ont été observés avec la des-acyl ghreline (48). Ces résultats suggèrent donc que la ghreline active la prolifération cellulaire des GH3 par l'activation des voies PKC-MAPK et tyrosine kinase. Cependant, l'effet prolifératif de la ghreline ne semble pas impliquer le GHS-R1a. Finalement, la ghreline induit la prolifération de pré-adipocytes en culture (3T3-L1) en activant ERK1/2 et IRS-1 associé à la voie de PI3 kinase/Akt (41). Il est possible que dans cette étude la prolifération induite par la ghreline soit dépendante de la liaison du GHS-R1a, puisqu'il est exprimé dans les cellules 3T3-L1 non différenciées et différenciées (41).

Il est connu que la ghreline exerce un effet cardioprotecteur à travers un mécanisme encore inconnu, indépendamment de la relâche de la GH. Une seule étude a démontré jusqu'à présent un effet de survie cellulaire de la ghreline dans les cardiomyocytes (H9c2) et dans les cellules endothéliales (PAE) (203). Dans cette étude, autant la ghreline que la des-acyl ghreline inhibent l'apoptose des deux types cellulaires. L'action de la ghreline et de la des-acyl ghreline a lieu via l'activation des voies de signalisation MAPK (ERK1/2) et Akt. Il est montré que les deux formes de ghreline reconnaissent un site commun de haute affinité sur les cellules H9c2, lesquelles n'expriment pas le GHS-R1a. Cette étude suggère donc que la ghreline, indépendamment de son acylation, serait un facteur de survie en agissant directement sur le système cardiovasculaire via un récepteur encore inconnu.

Ces résultats démontrent que la ghreline joue un rôle important dans la prolifération et la survie cellulaires de différents types cellulaires sains et tumoraux. Dans certaines études, l'effet de la ghreline semble passer par le GHS-R1a alors que dans d'autres, un nouveau récepteur semble être responsable de l'effet de la ghreline et de la des-acyl ghreline. Malgré l'implication ou non du GHS-R1a, deux principales voies de signalisation

Type cellulaire	Pro- ou anti-prolifération	Expression du GHS-R1a	Effet de la des-acyl ghreline	Implication du GHS-R1a	Voies de signalisation impliquées	Année de publication	Réf.
Cellules de carcinomes mammaires humains	anti	non	même effet que la ghreline	non	non étudiées	2001	50
						2003	201
Cardiomyocytes (H9c2)	pro	non	non étudié	non	non étudiées	2002	200
Cardiomyocytes (H9c2)	survie	non	même effet que la ghreline	non	ERK1/2 et PI3K/Akt	2002	203
Cellules endothéliales (PAE)	survie	?	même effet que la ghreline	non	non étudiées	2002	203
Cellules d'hépatomes	pro	oui	non étudié	?	MAPK	2002	52
Cellules cancéreuses de prostate humaine	pro	oui	non étudié	?	non étudiées	2002	35
						2003	201
Cellules d'adénocarcinomes pancréatiques	pro	oui	non étudié	oui utilisation de D-Lys-GHRP-6	PI3K/Akt	2003	49
Cellules de carcinomes thyroïdiens	anti	non	non étudié	non	non étudiées	2003	98
Cellules du cortex surrénalien (ZG) de rat et humain	pro	oui	non étudié	?	Tyrosine kinase et MAPK p42/p44	2003	199
						2004	202
Cellules de carcinomes de prostate humaine	anti	non	même effet que la ghreline	non	non étudiées	2004	204
Cellules hypophysaires de rat (GH3)	pro	oui	même effet que la ghreline	?	PKC, MAPK (ERK1/2) et tyrosine kinase	2004	48
Pré-adipocytes (3T3-L1) et adipocytes	pro	oui	non étudié	?	ERK1/2 et PI3K/Akt	2004	41
Cellules ostéoblastiques de rat	pro	oui	non étudié	oui utilisation de D-Lys-GHRP-6 (30)	non étudiées	2005	29
						2005	30
Cellules ostéoblastiques de souris (MC3T3-E1)	pro	oui	non étudié	oui utilisation de D-Lys-GHRP-6	MAPK (ERK1/2)	2005	31

Tableau III : Résumé des études publiées sur le rôle de la ghreline dans la prolifération et la survie de différents types de cellules

semblent être impliquées dans la prolifération et la survie cellulaires induites par la ghreline : MAPK (ERK1/2) et PI3 kinase/Akt. D'autres études devront être réalisées pour élucider le récepteur exact impliqué dans la prolifération et la survie cellulaires médiées par la ghreline.

1.5.5 Effets de la des-acyl ghreline via un récepteur distinct du GHS-R1a

Lors de la découverte de la ghreline, plusieurs isoformes ont été identifiés. Il a été démontré que le groupement n-octanoylé de la ghreline est essentiel à l'action de la ghreline sur le GHS-R1a (83;84). Au départ, aucune action biologique n'avait été identifiée pour la forme non octanoylée de la ghreline (des-acyl ghreline), malgré une concentration plus importante dans la circulation sanguine. Depuis peu, il a été découvert que la des-acyl ghreline exerce certaines activités biologiques qu'elle partage avec la ghreline dans différents types cellulaires. Ces actions ont lieu via l'activation d'un récepteur commun, distinct du GHS-R1a et non caractérisé. Il a donc été montré que la des-acyl ghreline stimule la prolifération des cellules hypophysaires GH3 (48) alors qu'elle l'inhibe dans les néoplasmes de prostate (204). Elle inhibe également la mort cellulaire des cardiomyocytes de rat H9c2 et des cellules endothéliales (203). De plus, la des-acyl ghreline, comme la ghreline, induit l'adipogénèse *in vivo* (168) et inhibe la lipolyse induite par l'isoprotérénol, un agoniste non sélectif aux récepteurs β -adrénergiques dans les adipocytes de rat (169). Finalement, la des-acyl ghreline aurait un effet inotrope négatif sur le muscle papillaire du cœur (205). Cependant, contrairement à la ghreline octanoylée, la forme non octanoylée induit une balance énergétique négative en diminuant la prise de nourriture et en retardant le remplissage gastrique, par une action passant par l'hypothalamus (206). Ces études démontrent maintenant que la des-acyl ghreline partage des actions biologiques avec la ghreline par un mécanisme encore inconnu, indépendant du GHS-R1a.

1.5.6 La ghreline et les pathologies

Par ses nombreux rôles dans l'organisme, il semble évident que la ghreline soit impliquée en situation pathologique. En effet, des modifications du niveau plasmatique de la ghreline sont observées dans plusieurs pathologies. Cependant, les mécanismes exacts de la ghreline ne sont pas encore clairs. Tout d'abord, des taux élevés de ghreline ont été trouvés chez des patients anorexiques (95;110;207-210) et atteints de maladies cardiaques (194). Il est connu qu'en période de jeun la concentration circulante de ghreline est augmentée (101). Un gain de poids chez une personne anorexique diminue son taux sanguin de ghreline (95;211). Contrairement aux personnes saines, les personnes anorexiques ne montrent pas de diminution du niveau de ghreline suite à la prise de nourriture, probablement due à une adaptation chronique d'une restriction prolongée d'aliments (208;210). Par contre, chez des patients obèses, le taux de ghreline est très faible comparativement aux personnes normales (109;212). Une perte de poids chez les personnes obèses augmente brusquement le niveau circulant de ghreline un peu avant les repas (213;214). La chute normale des taux de ghreline suite à un repas est moins importante chez les patients obèses (213). Des patients atteints de diabète de type 2, de résistance à l'insuline, d'hypertension (215) et d'hyperthyroïdisme (130) montrent un taux de ghreline diminué alors que des patients déficients en GH (117;120;121) ou qui possèdent certaines tumeurs (46;51;216) montrent un niveau élevé de ghreline. Finalement, de plus en plus d'évidences suggèrent que la ghreline jouerait un rôle dans le développement de l'athérosclérose, ce qui sera discuté dans la prochaine section. Dans certaines maladies, la ghreline pourrait être une cible thérapeutique intéressante. Cependant, par sa grande diversité d'actions, il pourrait être difficile de cibler un problème en particulier. D'autres études sont essentielles pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la ghreline dans ses différents rôles.

1.6 Relation entre le système Ghreline/GHS-R1a et l'athérosclérose

1.6.1 L'athérosclérose

1.6.1.1 Introduction

L'athérosclérose est la cause première des maladies du cœur en Amérique du Nord. Cette maladie inflammatoire chronique affecte les moyennes et les grandes artères. L'athérosclérose est associée à de nombreux facteurs de risque, autant environnementaux que génétiques. Cependant, le taux élevé de mauvais cholestérol, les lipoprotéines de faible densité (LDL), semble être le principal facteur de risque qui participe au développement de la pathologie, en s'accumulant dans la paroi artérielle. L'utilisation de modèles animaux génétiquement modifiés a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'athérosclérose, mais beaucoup d'études sont encore à venir.

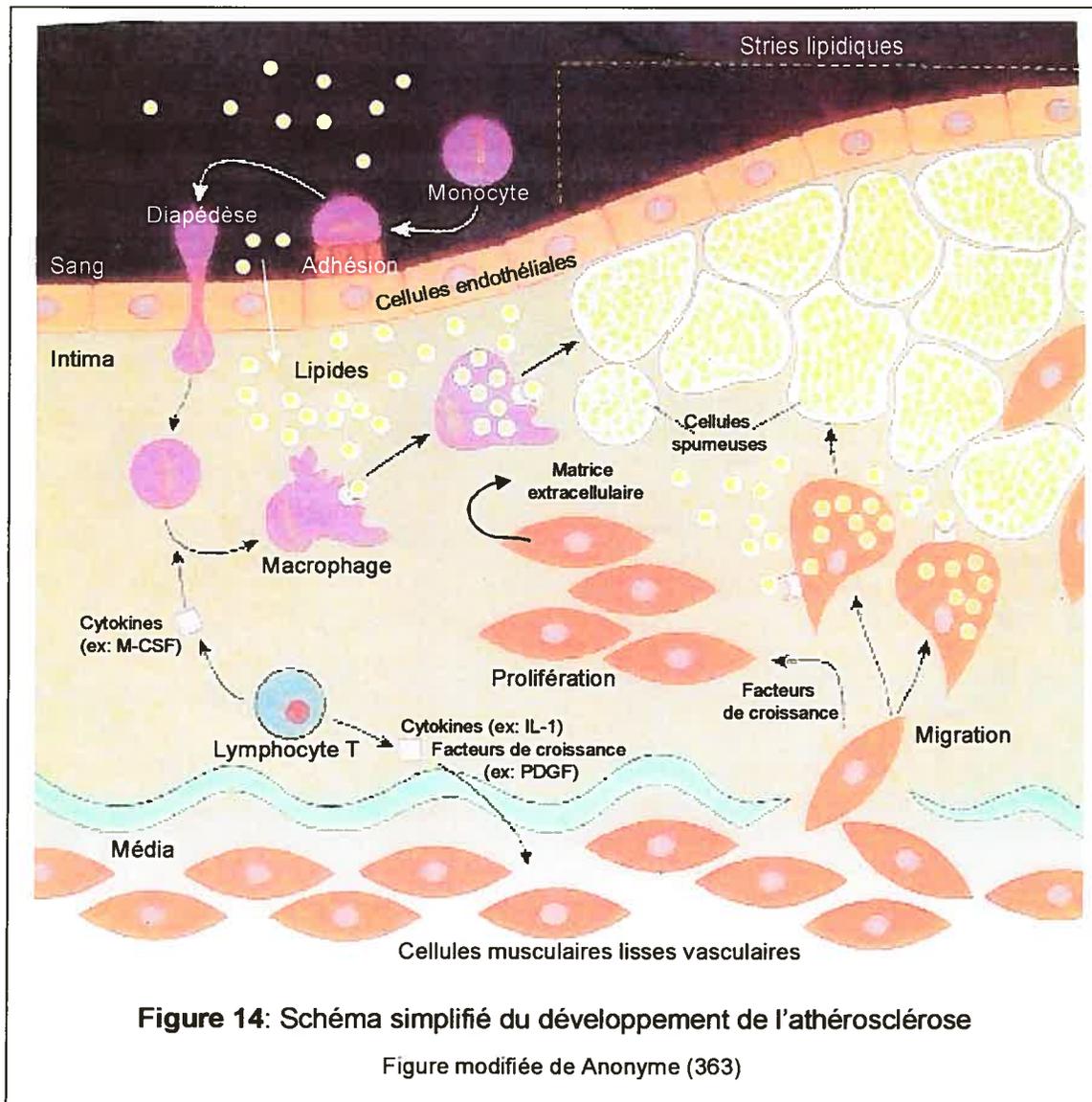
Pour étudier les différents mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de l'athérosclérose, deux modèles de souris génétiquement modifiés sont couramment utilisés. La souris déficiente en apolipoprotéine E (apoE) et la souris déficiente en récepteurs des LDL développent des lésions athérosclérotiques avancées, lesquelles apparaissent rapidement sous une diète riche en lipides.

1.6.1.2 Les stades de la formation des lésions athérosclérotiques

L'athérosclérose est une maladie progressive qui implique différents types cellulaires, dont les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), les monocytes/macrophages et les lymphocytes (Figure

14). Le premier signe observable de l'athérosclérose est l'accumulation de lipoprotéines dans l'intima, la région subendothéliale de la paroi vasculaire. L'accumulation est accrue lors d'une augmentation du niveau circulant de LDL. Les LDL ont la capacité de diffuser passivement à travers la monocouche de cellules endothéliales. Dans la région subendothéliale, les LDL subissent différentes modifications, dont la plus importante est l'oxydation. Plusieurs niveaux d'oxydation des LDL existent, passant de LDL faiblement oxydés (« minimally oxidized LDL ») à très fortement oxydés. Ce sont les LDL faiblement oxydés qui seraient les plus athérogènes, mais une oxydation plus forte leur permet de se lier aux récepteurs scavengers des macrophages. L'accumulation de LDL oxydés (LDLox) dans les artères stimule la production de molécules pro-inflammatoires par les cellules endothéliales, dont les molécules d'adhésion et les facteurs de croissance. Ces molécules pro-inflammatoires peuvent recruter à la surface de la monocouche de cellules endothéliales les monocytes et les lymphocytes. Les LDLox affectent aussi la fonction endothéliale. De plus, les LDLox inhibent la production d'oxyde nitrique (NO), une molécule anti-athérogénique. Le NO joue un rôle dans la vasorelaxation, ce qui diminue les risques d'athérosclérose.

À l'état normal, les monocytes/macrophages et les lymphocytes sont absents de l'intima de la paroi vasculaire. Ces cellules sont recrutées dans le but premier d'éliminer les LDLox qui s'accumulent dans cette région. L'entrée des monocytes dans l'intima est médiée par les molécules d'adhésion (exemples: sélectines, ICAM, VCAM, intégrines) et les facteurs chimiotactiques. Cette entrée se fait en plusieurs étapes: adhésion aux cellules endothéliales, roulement et diapédèse. Le recrutement des monocytes est une étape cruciale dans le développement de l'athérosclérose. Une fois transmigrés, les monocytes se différencient en macrophages grâce à la cytokine M-CSF (macrophage colony-stimulating factor). Cette cytokine influence les fonctions des macrophages, dont l'expression des récepteurs scavengers à la surface.



Les LDL fortement oxydés se lient à ces récepteurs et ils sont internalisés dans les macrophages. Le CD36 et le SR-A (récepteur scavenger de type A) font partie de la famille des récepteurs scavengers dont la caractéristique est de posséder plusieurs ligands. L'expression du CD36 est essentielle à la formation des lésions (217). Il est régulé de façon positive par le « peroxisome proliferator-activated receptor- γ » (PPAR γ), un récepteur nucléaire impliqué dans le métabolisme des lipides (218). L'accumulation de lipides dans les

macrophages mène à la formation de cellules spumeuses. La formation des cellules spumeuses peut être la conséquence d'une perturbation de l'homéostasie du cholestérol de la cellule (219). Les LDLox capturés par les macrophages sont métabolisés et le cholestérol libre est expulsé hors de la cellule par un mécanisme d'efflux. L'apoE, l'ABCA1 (ATP-binding cassette A1) et le SR-B1, régulés par le PPAR γ et le LXR (liver-x-receptor), participent au mécanisme d'efflux (219). Dans les cellules spumeuses gorgées de lipides, la capture des LDLox est beaucoup plus importante que l'efflux.

Par la suite, il y a formation de la plaque fibreuse (stries lipidiques) caractérisée par une grande accumulation de lipides extracellulaires, de CMLV et de matrice extracellulaire dans l'intima. La migration et la prolifération des CMLV de la média vers l'intima est une étape importante dans le développement de l'athérosclérose. Habituellement, ces cellules sont incapables de migrer et ont un taux de prolifération très faible. Cependant, la migration et la prolifération de ces cellules sont possibles par la stimulation de cytokines (exemple : interleukine-1) et de facteurs de croissance (exemple : PDGF) sécrétés par les macrophages et les lymphocytes T activés. Les CMLV changent alors de phénotype et deviennent des cellules sécrétrices, pouvant synthétiser et sécréter de la matrice extracellulaire (exemple : collagène). Dans l'intima, les CMLV captent aussi des LDLox via les récepteurs scavengers et deviennent des cellules spumeuses comme les macrophages.

À un état plus avancé, la plaque athérosclérotique développe un noyau nécrotique causé par la mort des cellules spumeuses. La plaque est stable lorsqu'elle est composée d'une quantité plus importante de matrice extracellulaire et de CMLV. Cependant, la plaque est susceptible à une rupture lorsqu'elle est constituée d'un nombre accru de cellules inflammatoires et de différentes protéases (exemple : collagénase) sécrétées par les macrophages, qui dégradent la matrice extracellulaire. Suite à la dégradation de la matrice

extracellulaire, la plaque se fragilise, se rompt et expose les facteurs pro-coagulants à la circulation sanguine, menant à la formation d'un thrombus. Les événements coronariens causés par une thrombose dépendent de la composition et de la vulnérabilité de la plaque fibreuse. Les lésions athérosclérotiques peuvent devenir très larges et bloquer la lumière de l'artère, mais la rupture de la plaque est la plus courante chez les patients. La stabilité de la plaque peut aussi être influencée par la calcification et la néovascularisation. (Résumé de (220))

1.6.1.3 Les événements critiques de l'athérosclérose

Durant la formation des lésions athérosclérotiques, plusieurs étapes ou molécules sont importantes ou même cruciales au développement de la pathologie. Les modèles de souris génétiquement modifiés sont souvent utilisés pour déterminer l'importance d'une molécule dans la progression de l'athérosclérose. Une première étape importante au développement des lésions est l'oxydation des LDL dans l'intima. Il a été montré qu'une souris déficiente en 12/15-lipoxygénase développe moins de plaques athérosclérotiques. Cette enzyme a pour rôle d'incorporer une molécule d'oxygène aux acides gras. Dans la paroi vasculaire, elle serait impliquée dans l'oxydation des LDL (221). Son rôle dans la pathologie a été confirmé chez des souris déficientes en récepteurs des LDL qui surexpriment la 12/15-lipoxygénase (222).

Le recrutement des monocytes à la surface de la monocouche de cellules endothéliales est l'une des étapes les plus importantes. Plusieurs molécules d'adhésion entrent en jeu pour permettre ce recrutement à la paroi vasculaire. Par exemple, des souris déficientes en P- ou E-sélectines ou en ICAM (intercellular adhesion molecule) démontrent l'importance de ces molécules d'adhésion dans le développement de l'athérosclérose, puisqu'une

protection contre l'athérosclérose est observée (223;224). La transmigration des monocytes à travers la monocouche de cellules endothéliales vers l'espace subendothélial est fortement stimulée par la chimiokine MCP-1 (macrophage chemotactic protein-1), laquelle est exprimée et sécrétée par les cellules endothéliales et musculaires lisses en réponse aux LDLox. Le rôle important de MCP-1 dans l'athérogénèse a été souligné dans une étude utilisant un croisement de souris déficientes en récepteurs des LDL et des souris déficientes en MCP-1. Une réduction des lésions de plus de 80% a été observée dans ce modèle de souris (225). De plus, des souris déficientes en MCP-1 ou en ses récepteurs CCR2 (C-C chemokine receptor 2) ont une diminution significative des plaques, ce qui suggère que l'interaction entre MCP-1 et CCR2 est impliqué dans le recrutement des monocytes au cours de l'athérosclérose (225;226).

La cytokine M-CSF stimule la différenciation des monocytes en macrophages et influence leurs fonctions, dont l'expression des récepteurs scavengers. M-CSF semble essentiel durant la formation des lésions athérosclérotiques, puisque des souris ostéopérotiques, caractérisées par une mutation au niveau du gène M-CSF, ont une réduction importante des lésions (227;228). Les récepteurs scavengers des macrophages capturent les LDLox, menant à la formation de cellules spumeuses. Il est rapporté que les souris déficientes en CD36 (récepteur scavengeur) montrent une diminution significative des lésions athérosclérotiques (217).

Finalement, une étape également cruciale dans l'évolution de la pathologie est la migration et la prolifération des CMLV. De nombreuses molécules influencent la migration et la prolifération cellulaires de ces cellules situées normalement dans la média de la paroi vasculaire. Les macrophages et les lymphocytes T activés de l'intima produisent des cytokines et des facteurs de croissance qui vont stimuler les CMLV à changer de phénotype.

L'hypertension, très souvent observé en situation d'athérosclérose, influence aussi les CMLV. L'angiotensine II (ang II), l'effecteur du système rénine-angiotensine, joue plusieurs rôles durant l'athérosclérose. Elle stimule, entre autres, la croissance des CMLV, la production de cytokines pro-inflammatoires et de matrice extracellulaire par ces cellules (229). Il a aussi été montré que des rats spontanément hypertendus (SHR), caractérisés par une pression sanguine élevée, stimule l'expression de PDGF qui est un puissant agent mitogénique des CMLV (230). De plus, il est rapporté qu'une infection au cytomégalovirus participe au développement de l'athérosclérose (231). Ce virus a également la capacité de stimuler la migration et la prolifération des CMLV (232;233). Ces étapes critiques du développement de l'athérosclérose sont des cibles thérapeutiques intéressantes. (220;234)

1.6.1.4 Mécanismes moléculaires impliqués dans les cellules musculaires lisses vasculaires au cours de l'athérosclérose

Dans la paroi vasculaire, les cellules musculaires lisses contribuent au contrôle du tonus vasculaire et à la pression artérielle. À l'état normal, elles sont incapables de se diviser et prolifèrent à un taux très bas. De plus, ces cellules n'ont normalement qu'une très faible activité sécrétrice. Cependant, en réponse à un dommage vasculaire, les CMLV augmentent leur taux de prolifération cellulaire, de migration et de capacité de synthèse. Les changements phénotypiques de ces cellules jouent un rôle critique dans la pathologie de l'athérosclérose (235).

Suite à un dommage vasculaire, plusieurs molécules s'accumulent ou sont sécrétées dans la paroi vasculaire et influencent les CMLV à migrer, proliférer et produire des cytokines pro-inflammatoires, mais aussi à devenir des cellules spumeuses. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans ces processus suite à la stimulation des CMLV.

1.6.1.4.1 Migration et prolifération cellulaires

Au cours de l'athérosclérose, les CMLV vont migrer et proliférer de la média vers l'intima, une étape critique de la pathologie. Plusieurs molécules présentes dans la paroi vasculaire peuvent influencer la migration ainsi que la prolifération des CMLV, dont l'ang II, le PDGF et les LDLox.

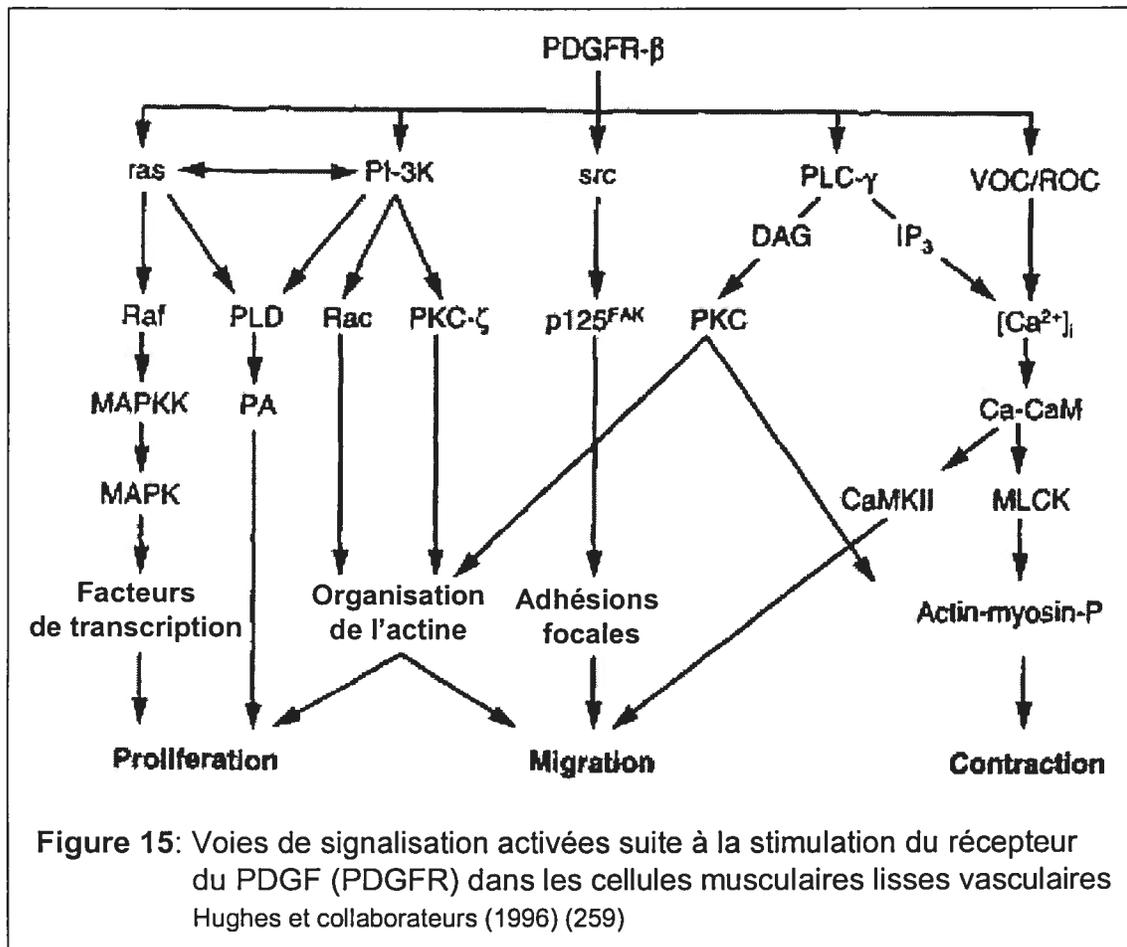
Ang II :

L'ang II joue un rôle crucial dans les pathologies de l'athérosclérose et de l'hypertension à plusieurs niveaux via son récepteur AT1. Il a été démontré que l'hypertension induite par l'ang II augmente significativement les plaques athérosclérotiques chez des souris déficientes en apoE (236). Ce puissant peptide vasoactif est l'effecteur principal du système rénine-angiotensine. Au niveau des CMLV, l'ang II stimule la synthèse protéique (hypertrophie) (237), la production de la matrice extracellulaire et l'expression de facteurs de croissance. Cependant, la synthèse d'ADN (hyperplasie) n'est seulement induite par ce peptide qu'en présence de sérum (238). Ceci s'explique par l'incapacité de l'ang II à inactiver un inhibiteur de la progression du cycle cellulaire, le « cyclin-dépendent kinase inhibitor p27^{KIP1} » (239). L'ang II peut donc stimuler la prolifération des CMLV en interagissant avec d'autres facteurs de croissance. Plusieurs voies de signalisation sont stimulées dans les CMLV en réponse à l'ang II, via le récepteur AT1 qui est couplé à la protéine G_q. Les voies des MAPK ERK1/2, JNK et p38 sont activées ainsi que celle de JAK/STAT (240-243). Il a été rapporté que la stimulation de la voie de ERK1/2 par l'ang II dans les CMLV passe par l'activation de la tyrosine kinase sur les récepteurs des facteurs de croissance (exemple : récepteur de l'EGF) induite par l'augmentation de calcium intracellulaire (244). Ces différentes voies convergent afin de stimuler la transcription de plusieurs facteurs, dont AP-1. Ce dernier initie l'expression de différents gènes pro-athérogéniques (exemple :

TGF- β). Une stimulation à l'ang II induit donc la production de plusieurs facteurs de croissance dans les CMLV, tels que TGF- β (facteur de croissance tumoral beta) (245;246), PDGF (247-249), IGF-1 (insulin-like growth factor 1) (250) et bFGF (basic fibroblast growth factor) (251). Contrairement à son action pro-apoptotique dans les cellules endothéliales, l'ang II stimule la survie des CMLV en inhibant l'apoptose médiée par le NO (252). (229)

PDGF :

Le facteur de croissance PDGF joue également un rôle dans l'athérosclérose. À l'état normal, son niveau plasmatique est très faible. Cependant, lors d'un dommage vasculaire, plusieurs types cellulaires produisent du PDGF, dont les plaquettes, les macrophages et les cellules endothéliales. Le PDGF est un puissant chimioattracteur qui stimule de façon paracrine la prolifération et la migration des CMLV. Il a été montré que le PDGF peut aussi être produit par les CMLV suite à une stimulation à l'ang II (247-249), aux LDL (253;254), à l'IL-1 (interleukine-1) (255), au TGF- β (256;257) ou au TNF α (facteur nécrosant des tumeurs alpha) (258). Différentes voies de signalisation sont impliquées dans la mitogénèse des CMLV induite par le PDGF. Ces voies sont illustrées à la figure 15. La voie des MAPK est connue pour jouer un rôle important dans la réponse mitogénique d'un facteur de croissance. Les voies de PI3 kinase et de PLC γ sont également activées par le PDGF dans les CMLV. L'augmentation du calcium intracellulaire joue aussi un rôle dans la prolifération des CMLV. La production de l'IP $_3$ suite à l'activation de la PLC γ est l'un des seuls mécanismes par lequel le PDGF augmente la concentration intracellulaire du calcium. Le PDGF est un bon exemple qu'il existe des interrelations entre différentes voies de signalisation, résultant d'une prolifération et migration des CMLV. (235;259;260)



LDLox :

L'implication des LDLox dans la pathologie de l'athérosclérose est cruciale. Ils possèdent des propriétés athérogéniques et leurs rôles principaux sont de recruter les monocytes et de stimuler la formation de cellules spumeuses. Les LDL induisent aussi la mitogénèse des monocytes et des CMLV (261;262). Il a été rapporté que les LDLox stimulent la prolifération des CMLV (263;264). Le mécanisme par lequel les LDLox participent à la prolifération des CMLV a beaucoup été étudié. Il est maintenant évident que la prolifération des CMLV induite par les LDLox est médiée entre autres par l'activation de la voie Ras/Raf/MEK/MAPK, plus particulièrement ERK1/2, similaire au PDGF (265;266). L'activation de cette voie est stimulée par un

récepteur couplé à la protéine G_q et régulée par PKC, Ca^{2+} et une tyrosine kinase (265). En effet, les LDLox partagent plusieurs propriétés des facteurs de croissance dans la signalisation impliquée dans la prolifération cellulaire. Plus récemment, une étude a montré que les LDLox activent la prolifération des CMLV via les phosphorylations de Akt et de la MAPK ERK1/2, lesquelles sont inhibées par des inhibiteurs de PI3 kinase. Un inhibiteur de MEK1/2 atténue la phosphorylation de ERK1/2, mais aucun effet n'est observé sur la phosphorylation de Akt. Cette étude suggère que les LDLox activent la prolifération des CMLV via l'activation de PI3 kinase/Akt/MEK/ERK (267). De plus, l'augmentation du calcium intracellulaire serait peut-être nécessaire dans la transduction du signal en réponse aux LDLox dans les CMLV. Il a été montré qu'un bloqueur des canaux calciques, qui inhibe l'entrée de calcium, empêche la phosphorylation de Akt suite à une stimulation aux LDLox (267). Les LDLox, accumulés dans la paroi vasculaire lors du développement de l'athérosclérose, stimulent la formation de cellules spumeuses, mais également la prolifération des macrophages et des CMLV. Dans les CMLV, les LDLox stimulent la prolifération cellulaire via une interrelation des voies Akt et MAPK, lesquelles jouent un rôle important dans la régulation de la survie cellulaire et la mitogénèse.

PPAR γ :

L'activation du récepteur nucléaire PPAR γ , discuté plus en détail à la section 1.6.1.4.3, inhibe la prolifération et la migration des CMLV (268-271). Il a été rapporté qu'un activateur de PPAR γ , la troglitazone, inhibe l'activation de la voie MAPK et la prolifération des CMLV induites par l'ang II ainsi que l'expression du récepteur AT1 (272-276). Cependant, l'ang II peut réguler de façon négative l'expression du PPAR γ (277). Il a aussi été montré que les facteurs de croissance EGF et PDGF phosphorylent PPAR γ via la voie de MAPK, diminuant ainsi son activité transcriptionnelle (278;279). Contrairement

à d'autres protéines, une phosphorylation de PPAR γ en sérine 82 par les MAPK inhibe son activité transcriptionnelle dépendante et indépendante du ligand. En effet, un site consensus de MAPK a été trouvé dans le domaine N-terminal de PPAR (279). L'activation du PPAR γ peut avoir des effets anti-athérosclérotiques en inhibant la prolifération et la migration des CMLV.

1.6.1.4.2 Inflammation

L'athérosclérose est considérée comme un processus inflammatoire chronique (280). Le facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor- κ B) joue un rôle très important dans l'inflammation puisqu'il est activé suite à des stimuli inflammatoires. Il est exprimé dans de nombreux types cellulaires, tels que les cellules endothéliales, les CMLV et les monocytes. En situation normale, le NF- κ B est situé dans le cytoplasme sous forme inactive, associé à une protéine inhibitrice I κ B (inhibitor of NF- κ B). Lorsqu'un stimulus inflammatoire active la cellule, l'inhibiteur I κ B est phosphorylé et dégradé par le protéasome. Le NF- κ B devient alors actif et peut transloquer au noyau. Une fois activé, il initie la transcription de différents gènes impliqués dans l'inflammation, dont VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecule-1), MCP-1 et IL-6.

L'ang II active la voie de NF- κ B dans différents types cellulaires via le récepteur AT1 (281-283). Ce récepteur activé stimule l'oxydase NAD(P)H qui va induire la production d'ions superoxydes. Ceux-ci sont convertis ensuite en H₂O₂ par la superoxyde dismutase, qui vont agir sur le complexe NF- κ B/I κ B pour activer NF- κ B (229). Il a aussi été montré que les LDLox activent la voie de NF- κ B dans les vaisseaux sanguins via le stress oxydatif (284).

Au niveau des cellules endothéliales et des CMLV, l'activation de la voie de NF- κ B par l'ang II stimule la production de molécules d'adhésion cellulaire, telles que VCAM-1, ICAM-1, E-sélectine. Ces dernières stimulent l'adhérence,

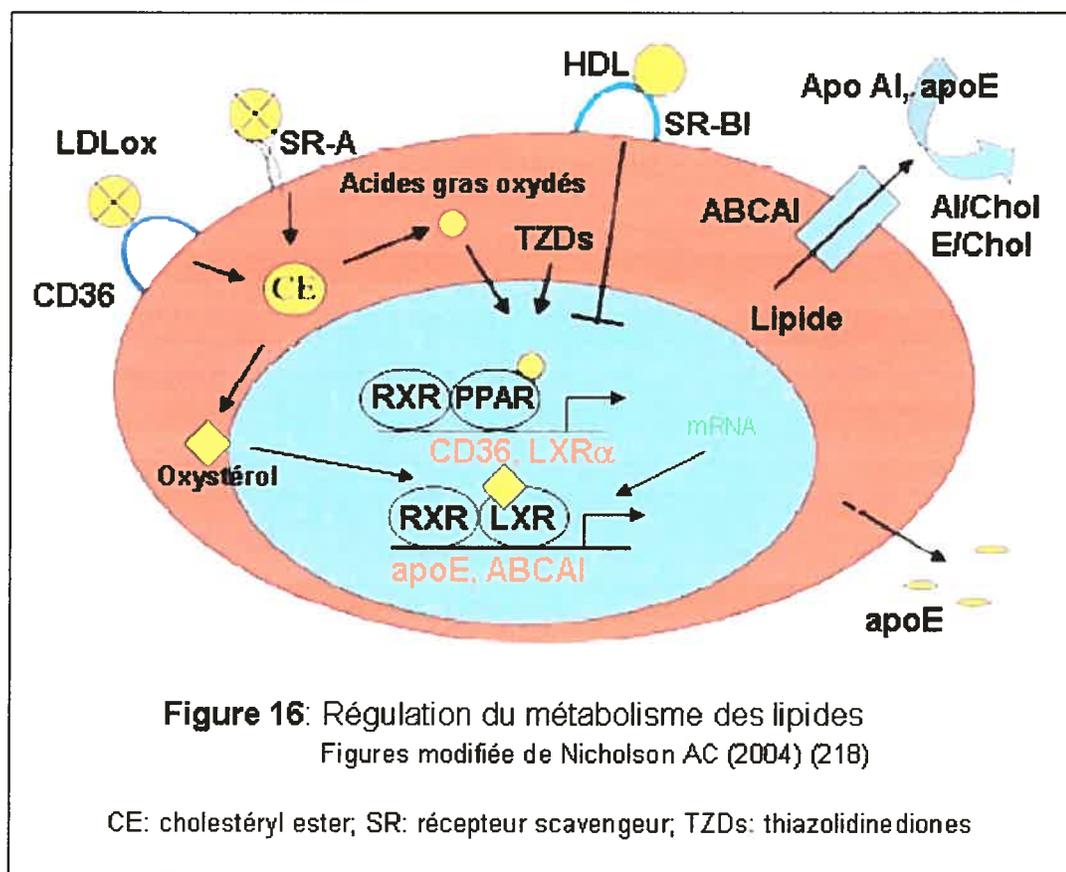
la migration et l'accumulation de monocytes et de lymphocytes T dans la paroi vasculaire. Une production de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires résulte aussi de l'activation de la voie de NF- κ B induite par l'ang II dans les CMLV. Parmi ces molécules sécrétées, on retrouve MCP-1, TNF α , IL-6, qui participent au processus d'inflammation (285-287). Par exemple, MCP-1 joue un rôle dans le recrutement et l'activation des monocytes et lymphocytes T au cours de l'athérosclérose (288). Le système rénine-angiotensine contribue donc à l'initiation et à la progression du processus inflammatoire dans la pathologie de l'athérosclérose, en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires dans les CMLV.

Les récepteurs nucléaires PPARs, discutés plus en détail à la section 1.6.1.4.3, sont aussi impliqués dans le processus inflammatoire. Il a été montré dans les CMLV que des activateurs de PPAR α , comme les fibrates, inhibent l'expression de gènes pro-inflammatoires (exemple : IL-6 et COX-2 (cyclooxygénase-2)) en régulant de façon négative les voies de signalisation d'AP-1, de NF- κ B et de STAT (289-291). Le PPAR joue donc un rôle anti-athérosclérotique indépendant du métabolisme des lipides.

1.6.1.4.3 Formation de cellules spumeuses

La transformation des macrophages et des CMLV en cellules spumeuses par l'accumulation intracellulaire des LDLox contribue grandement au développement de l'athérosclérose. L'internalisation des LDLox dans la cellule se fait via les récepteurs scavengers de classe B, dont le CD36. Le mécanisme moléculaire qui participe principalement à la formation des cellules spumeuses est la voie de PPAR γ , lequel augmente l'expression du CD36 pour la capture des LDLox et des transporteurs ABC pour l'efflux du cholestérol (Figure 16). Une entrée plus importante des lipides dans la cellule

comparativement à l'efflux du cholestérol favorise le développement de cellules spumeuses.



CD36 :

Le CD36 fait partie de la famille des récepteurs scavengeurs (SR), aussi appelée récepteurs multiligands, puisqu'ils ont la capacité de lier différents types de ligands (292). Le CD36 est exprimé dans plusieurs types cellulaires, dont les adipocytes, les cellules endothéliales, les monocytes/macrophages et les CMLV (293;294). Il est connu que les récepteurs de classe B, surtout le CD36, jouent un rôle important dans le métabolisme des lipides en interagissant avec les LDLox, pouvant mener à la formation de cellules

spumeuses au cours du développement de l'athérosclérose. En effet, des souris déficientes en CD36 ont montré une diminution de la liaison et de la capture des LDLox par les macrophages péritonéaux (295). De plus, des souris déficientes en CD36 et en apoE, soumises à une diète enrichie de cholestérol, développent 70% moins de lésions aortiques (217). Ces modèles démontrent un rôle important du CD36 dans la pathologie.

Comment le CD36 est-il régulé dans les cellules au cours du développement de l'athérosclérose? Il a été montré qu'une stimulation des macrophages en culture aux LDLox augmente l'expression de l'ARNm et la protéine du CD36 (296). L'effet des LDLox sur l'expression du CD36 est dû, en partie, à la stimulation du facteur transcriptionnel PPAR γ (297). Des activateurs de PPAR γ , tels le PGJ₂ et les thiazolidinediones (TZD; classe de médicaments anti-diabétiques), augmentent également l'expression du CD36 (297;298). Il a aussi été rapporté que l'augmentation de l'expression du CD36 par les LDLox est bloquée par des inhibiteurs de PKC. Cette étude suggère que l'augmentation de l'expression du CD36 implique l'activation de PKC, qui précède la stimulation de PPAR γ (299). De plus, la MAPK p38 serait nécessaire pour induire l'expression du CD36 par PPAR γ suite à la stimulation de la cellule aux LDLox (300). Le mécanisme d'induction du CD36 passe donc principalement par l'activation du PPAR γ .

PPAR γ :

Les facteurs transcriptionnels PPARs sont membres de la grande famille des hormones nucléaires et ils sont constitués de trois isoformes : α , γ et δ . Le PPAR γ et le PPAR α sont exprimés dans la plupart des types cellulaires impliqués dans l'athérosclérose (269;301;302). Les PPARs sont activés par différents métabolites naturels des acides gras, dont l'acide 9-hydroxy-octadéca-diénoate (9-HODE) et le 13-HODE. Le PGJ₂ et les thiazolidinediones

stimulent spécifiquement le PPAR γ , alors que le PPAR α est activé par les fibrates (289;297;303;304). Les facteurs transcriptionnels PPARs sont aussi stimulés en réponse à des cytokines ou facteurs de croissance, dont IL-4 et M-CSF (305-307). Plusieurs rôles dans la pathologie d'athérosclérose ont été attribués à l'activation du PPAR γ , dont la régulation positive de l'expression du CD36 (298). Le PPAR γ est essentiel pour la régulation basale du CD36 en réponse à ses ligands (308;309). Une fois activé par les LDLox, le PPAR γ forme un complexe avec le RXR (retinoid X receptor), lequel se lie à l'élément de réponse PPRE (peroxisome proliferator response element) situé sur le gène encodant pour le CD36 (Figure 16). Le complexe PPAR γ -RXR régule aussi la transcription de gènes qui encodent pour d'autres protéines impliquées dans l'adipogénèse et le métabolisme des lipides (310;311).

L'effet des agonistes du PPAR γ dans le développement de l'athérosclérose est controversé. Des études *in vitro* ont montré qu'un traitement à la troglitazone (un TZD) augmente significativement la capture des LDLox dans les macrophages THP-1 en culture (298), alors que deux équipes n'ont observé aucune différence significative de l'effet de la troglitazone sur l'expression du CD36 et la capture des LDLox (308;309). Une étude effectuée chez des souris déficientes en récepteurs des LDL a montré que la troglitazone inhibe la formation des lésions précoces de l'athérosclérose par une diminution de l'accumulation de macrophages au niveau de l'intima (312). Il a aussi été rapporté que les agonistes de PPAR γ (rosiglitazone et troglitazone) inhibent de façon significative le développement de l'athérosclérose chez des souris déficientes en récepteurs de LDL et déficientes en apoE, malgré une augmentation de l'expression du CD36 dans la paroi vasculaire (313;314).

Comment expliquer que l'activation de PPAR γ semble diminuer les lésions athérosclérotiques dans la plupart des études alors que l'expression du CD36 induite par le PPAR γ devrait provoquer un effet inverse? Le complexe

PPAR γ -RXR induit l'expression d'autres molécules, dont le LXR α . Ce récepteur nucléaire est activé par les oxystérols dérivés des LDLox, forme un complexe avec le RXR et stimule l'expression d'ABCA1 et d'apoE. L'ABCA1 est un transporteur de la famille « ATP-binding cassette » qui permet l'efflux du cholestérol médié par l'apoA1 (218;310;315). Malgré une augmentation du CD36 induite par PPAR γ , une hausse plus importante d'ABCA1 pourrait expliquer l'inhibition de la formation de cellules spumeuses par un mécanisme qui favorise la sortie du cholestérol plutôt que l'entrée. Cette situation a probablement lieu au début de la formation des lésions athérosclérotiques. Cependant, dans un stade plus avancé de la maladie, l'accumulation de LDLox dans la cellule est tellement élevée que les transporteurs ne fournissent plus pour expulser le cholestérol hors de la cellule. À ce moment, la cellule devient dysfonctionnelle et elle est appelée cellules spumeuses.

Certaines études montrent que l'activation du PPAR γ stimule la formation des lésions athérosclérotiques par l'augmentation de cellules spumeuses. Cependant, la plupart des études suggèrent plutôt un effet anti-athérosclérotique du PPAR dans le développement de l'athérosclérose en favorisant l'efflux du cholestérol, en inhibant l'inflammation, la prolifération cellulaire et l'adhésion des monocytes. De nombreux mécanismes participent au développement de l'athérosclérose, ce qui complique l'analyse de l'effet d'un seul mécanisme, comme l'activation du PPAR.

1.6.2 La ghreline et le GHS-R1a dans l'athérosclérose

L'ARNm de la ghreline et celui du GHS-R1a ne sont pas seulement détectés au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse, mais également dans le cœur et les vaisseaux (voir la section 1.3.4.2), impliquant des effets directs de la ghreline dans le système cardiovasculaire. Deux études ont rapporté une augmentation de la densité du récepteur de la ghreline en situation

d'athérosclérose. Katugampola et collaborateurs ont montré par des études de liaison que la liaison de la ghrelina est augmentée significativement de 4,6 fois dans des artères coronariennes athérosclérotiques (42). Cette même équipe a également observé une augmentation de la densité du récepteur de la ghrelina de 4,2 fois dans la média et les couches intimaes de cellules musculaires lisses au niveau des artères coronariennes athérosclérotiques (316). En plus de l'augmentation de la densité du récepteur de la ghrelina en situation d'athérosclérose, la ghrelina participe à de nombreux mécanismes impliqués dans l'athérosclérose, ce qui suggère un rôle de la ghrelina et de son récepteur dans cette pathologie.

Plusieurs études ont montré des effets bénéfiques de la ghrelina au niveau du système cardiovasculaire, ayant un lien avec la pathologie de l'athérosclérose. Tout d'abord, une injection intraveineuse de la ghrelina diminue de façon significative la pression sanguine chez des sujets sains (25). En situation d'athérosclérose, l'hypertension est souvent détectée. Il a aussi été rapporté que la ghrelina a un effet vasodilatateur chez des personnes en santé via un mécanisme indépendant de la GH/IGF-1/NO (317). Il est important de mentionner que la concentration plasmatique humaine de la ghrelina ($117,2 \pm 37,2$ fmol/mL) est très considérable pour un peptide vasoactif (83;318). Une autre équipe a montré que la ghrelina est un puissant antagoniste de l'action vasoconstrictrice de l'endothéline-1 (ET-1) dans les artères humaines (318). L'ET-1 est un peptide vasoconstricteur qui est synthétisé et sécrété par l'endothélium vasculaire (319;320). Il contribue au maintien normal du tonus vasculaire (321). Le niveau plasmatique de ce vasoconstricteur est augmenté dans les maladies cardiovasculaires, dont l'athérosclérose, menant à la hausse du tonus vasculaire coronarien (322-325). Il est également connu que le NO est un antagoniste de l'action vasoconstrictrice de l'ET-1 (326). Le NO est synthétisé à partir de la L-arginine par l'activation de la NO synthase endothéliale (eNOS) (327). En situation

d'athérosclérose, la voie de synthèse du NO est dysfonctionnelle, ce qui provoque un changement structural des vaisseaux (328). Le NO joue un rôle dans l'homéostasie vasculaire et il possède des propriétés anti-athérosclérotiques (329-332). Un rôle intéressant de la ghreline a été découvert par l'équipe de Shimizu qui a montré pour la première fois qu'une administration de ghreline chez des rats déficients en GH améliore la dysfonction endothéliale et augmente l'expression de eNOS dans l'aorte par un mécanisme indépendant de la GH (333). Il est intéressant de constater qu'une stimulation du GHS-R1a par l'hexaréline prévient également la dysfonction endothéliale indépendamment de la GH (334). La dysfonction endothéliale est observée dans les stades précoces de l'athérosclérose et participe à la formation des lésions (335). La prévention de la dysfonction endothéliale par la ghreline pourrait réduire les lésions athérosclérotiques. De plus, il a été rapporté que la ghreline inhibe l'apoptose des cellules endothéliales en culture via l'activation de la voie PI3 kinase/Akt (203). L'activation d'Akt stimule la phosphorylation et l'activation de eNOS, menant à la production de NO (336;337). La ghreline pourrait augmenter l'expression de eNOS par l'activation de cette voie.

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire. Il a été rapporté que la ghreline inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires, l'adhérence des cellules mononucléaires à l'endothélium et l'activation de NF- κ B (voie de signalisation impliquée dans l'inflammation) induites par le TNF α dans les cellules endothéliales humaines en culture (338). Cette action passerait par le GHS-R1a puisque la des-acyl ghreline, qui ne lie pas le GHS-R1a, n'a aucun effet. Cette étude suggère un rôle modulateur de la ghreline dans l'athérosclérose, spécialement chez des patients obèses dont le taux de ghreline est réduit (338). Il a aussi été montré que la ghreline inhibe l'expression de cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-1, IL-6 et TNF α , induite par la leptine dans les monocytes et les cellules T humaines (28). La

leptine induit l'inflammation et plusieurs de ses actions sont contraires à la ghreline (339). La ghreline semble donc jouer un rôle dans la prévention de l'inflammation, un phénomène très important dans le développement de l'athérosclérose.

Une question importante qui devrait être soulevée est l'effet de la ghreline dans l'athérosclérose : est-ce un agent pro- ou anti-athérosclérotique? Jusqu'à présent la majorité des études publiées dans la littérature suggère que la ghreline favorise la prévention du développement de l'athérosclérose. Cependant, aucune étude ne démontre clairement le rôle exact de la ghreline dans cette pathologie. Par contre, il semble évident qu'elle a probablement un rôle à jouer dans la formation des plaques athérosclérotiques. Des expériences futures devront être réalisées afin de connaître l'implication réelle de la ghreline au niveau de cette pathologie.

1.7 Hypothèse de travail

En plus de ses effets endocriniens, la ghreline joue plusieurs rôles au niveau du système cardiovasculaire indépendamment de la relâche de la GH. Entre autres, la ghreline est un agent vasodilatateur (25;317;318), diminue la pression artérielle (25;192), augmente la contractilité cardiaque (25). L'expression du GHS-R1a est de plus observée dans le système cardiovasculaire, par exemple dans le cœur et l'aorte (19;25). Katugampola et collaborateurs ont rapporté une augmentation de la densité du récepteur de la ghreline dans des artères coronariennes athérosclérotiques (42), suggérant un rôle potentiel de la ghreline dans le développement de l'athérosclérose. Cependant, le mécanisme d'action de la ghreline est encore inconnu.

L'athérosclérose est une maladie complexe qui implique différents types de cellules, tels que les macrophages, les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires. La migration et la prolifération anormales des CMLV sont observées lors de la formation des plaques athérosclérotiques. Il a été montré que la ghreline stimule la prolifération de différents types cellulaires, dont les cellules hypophysaires (48), les cellules du cortex surrénalien (ZG) (199;202) et les adipocytes (3T3-L1) (41), en activant deux principales voies de signalisation impliquées dans ce processus, les voies de la MAPK ERK1/2 et de PI3 kinase/Akt. La ghreline stimulerait-elle également la prolifération des CMLV au cours de l'athérosclérose? Nos études préliminaires ont montré une expression par RT-PCR du GHS-R1a au niveau des CMLV, suggérant un rôle possible de la ghreline sur ce type cellulaire.

Basé sur ces observations, nous pensons que la ghreline activerait les voies de ERK1/2 et de PI3 kinase/Akt au niveau des CMLV, menant à la prolifération cellulaire et ainsi, participer au développement de l'athérosclérose. Le modèle de CMLV de rat Brown Norway a été choisi pour valider l'hypothèse.

La présence du GHS-R1a au niveau des CMLV sera tout d'abord analysée par immunobuvardage. Par la suite, l'effet de la ghreline sur les voies de signalisation ERK1/2 et PI3 kinase/Akt seront étudiées dans les CMLV par immunobuvardage à l'aide d'anticorps phosphospécifiques et par essai kinase *in vitro*. La spécificité de l'action de la ghreline médiée par le GHS-R1a sera analysée par l'utilisation de la forme non octanoylée de la ghreline, la des-acyl ghreline, qui n'a pas d'affinité pour le GHS-R1a (85;86). Puisque les voies de ERK1/2 et de PI3 kinase/Akt sont connues pour leur implication dans la prolifération cellulaire, la prolifération des CMLV induite par la ghreline sera évaluée.

2.0 Matériel et méthodes

2.1 Culture cellulaire

Les CMLV de rat Brown Norway (Dr Marc Servant, Université de Montréal) de passages 12 à 18 ont été cultivées dans du milieu DMEM (faible en glucose; Invitrogen) additionné de 10% de sérum de veau (Invitrogen). Les cellules GH3 (cellules tumorales hypophysaires; passages 3 et 6; ATCC) et J774 (monocytes de souris; ATCC) ont été cultivées dans du milieu DMEM (haut taux de glucose; Invitrogen) additionné de 10% de sérum de bovin fœtal (Invitrogen). Les différents types cellulaires ont été conservés dans un environnement contenant 5% de CO₂ à 37°C. À 80% de confluence, les CMLV et GH3, formant une monocouche de cellules, ont été dissociées par l'action de la trypsine (0,25% de trypsine/EDTA; Invitrogen) alors que les J774 ont été récoltés au grattoir lors de leur passage.

2.2 Stimulation des cellules

Les cellules ont été mises dans des boîtes de pétri de 10 cm pour les expériences de stimulation. À 80% de confluence, l'état de quiescence cellulaire a été obtenu par l'utilisation d'un milieu sans sérum. Ainsi, les CMLV ont été cultivées pour 48 h dans un milieu composé de 50% de DMEM (haut taux de glucose; Invitrogen), 50% de F12 (Invitrogen), 5 µg/mL d'Apo-transferrine (Sigma), 15 mM d'Hepes pH 7,4 (Sigma) et 0,1% de BSA (Sigma). Pour les stimulations aux LPS (lipopolysaccharides; Sigma), les CMLV ont été incubées avec 0, 1, 10 ou 100 ng/mL de LPS pendant 4 h à 37°C. Pour les expériences d'immunobuvardage contre les protéines ERK1/2 et Akt phosphorylées et totales, les cellules ont été stimulées avec 100 nM de ghreline (Peptides International et NeoMPS) ou de des-acyl ghreline (Peptides International et NeoMPS) pendant 2, 5, 10 et 30 min. Les cellules ont

également été stimulées avec du PDGF-BB (50 ng/mL; Biosource) ou de l'ang II (100 nM; Sigma) pendant 10 min (contrôles positifs). Les inhibiteurs de PI3 kinase, LY294002 (30 µM; Calbiochem) et d'Akt, SH-5 (10 µM; Calbiochem), ont été ajoutés aux cellules 30 min avant la stimulation de 10 min à la ghreline, à la des-acyl ghreline ou au PDGF-BB. Pour l'essai kinase *in vitro* contre ERK1/2, les CMLV ont été incubées avec 100 nM de ghreline ou de des-acyl ghreline pendant 5, 15 et 30 min. Une stimulation des cellules à l'ang II (100 nM) pendant 5 min a servi de contrôle positif. Toutes les stimulations ont été réalisées à 37°C avec 5% de CO₂. À la fin de chaque temps de stimulation des cellules, le milieu cellulaire a été aspiré et les cellules ont été lavées une fois au PBS (phosphate buffer saline) (4°C). Finalement, la boîte de pétri a été déposée sur l'azote liquide pour congeler les cellules et préserver les voies de signalisation activées. Les boîtes de pétri ont été conservées à -80°C jusqu'au moment de l'extraction d'ARN total ou de protéines totales des cellules.

2.3 Extraction d'ARN total

Les boîtes de pétri ont été sorties du congélateur juste avant l'expérience d'extraction d'ARN total pour éviter la dégradation de l'ARN. L'ARN total des cellules a été extrait à l'aide du Trizol® (Invitrogen) selon le protocole de la compagnie. Un traitement à l'ADNase a été fait selon le protocole de la trousse commerciale « DNA-free™ » (Ambion). L'ARN total a été dosé au spectrophotomètre Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) à une longueur d'onde de 260 nm. Une lecture a également été faite à une longueur d'onde de 280 nm pour estimer la pureté de l'échantillon. Les échantillons d'ARN ont été conservés à -80°C.

2.4 RT-PCR

Une quantité de 0,5 µg d'ARN total a été utilisée pour la transcription inverse (RT). La réaction de RT (20 µL total) était composée de 0,5 µg d'amorce oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen), de 1 mM de dNTP (Invitrogen), de 40 unités d'inhibiteurs de ribonucléases (RNase Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor; Invitrogen), de 10 unités de la transcriptase inverse Transcriptor (Roche) et de son tampon. Le protocole utilisé a été celui de la fiche explicative de la Transcriptor de Roche. Pour chaque échantillon, une réaction de RT a été réalisée sans transcriptase inverse (remplacée par de l'eau) pour nous assurer que l'échantillon d'ARN total n'était pas contaminé par de l'ADN génomique. 2 µL de la réaction de RT ont été utilisés pour la réaction de PCR (50 µL total). À l'ADN complémentaire nouvellement synthétisé lors de la RT, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen), 0,5 µM d'amorces sens et anti-sens (Invitrogen), 2,0 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 2,5 unités de Taq DNA Polymerase (Invitrogen) et son tampon ont été ajoutés. Les amorces utilisées pour le *GHS-R1a* (314 paires de bases) sont : (sens) 5'-GAG ATC GCT CAG ATC AGC CAG TAC-3' et (anti-sens) 5'-TAA TCC CCA AAC TGA GGT TCT GC-3'. Les amorces utilisées pour le contrôle interne *GAPDH* (983 paires de bases) sont : (sens) 5'-TGA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG GC-3' et (anti-sens) 5'-GAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'. Le programme de PCR a commencé par une dénaturation de l'ADNc à 94°C pendant 3 min, suivie d'un cycle composé de 45 sec à 94°C, 30 sec à 65°C (*GHS-R1a*) ou 60°C (*GAPDH*) (température d'hybridation des amorces) et de 2 min à 72°C pour l'élongation. Le nombre de cycles a été de 40 et de 25 cycles pour les gènes *GHS-R1a* et *GAPDH* respectivement. Une dernière étape d'élongation à 72°C pendant 10 min a été faite à la fin du programme de PCR. Les réactions de PCR ont été réalisées dans le T3 Thermocycler (Biometra, Whatman). Les échantillons ont ensuite migré sur un gel de 2% d'agarose en présence de bromure d'éthidium. Les gels ont été exposés à la lampe UV du Typhoon 9410 (Amersham Biosciences)

et analysés avec le programme ImageQuant™ v5.2, Molecular Dynamics (Amersham Biosciences). Le ratio de l'intensité de la bande du *GHS-R1a* sur l'intensité de la bande du *GAPDH* a permis de comparer les échantillons entre eux.

2.5 Extraction de protéines totales

Les cellules ont été dégelées sur glace pendant 2 min et lysées pendant 30 min dans 300 µL de tampon de lyse conventionnel (50 mM de Tris-HCl pH 7,4, 150 mM de NaCl, 5 mM d'EDTA, 50 mM de NaF, 40 mM de β-glycérophosphate, 1% de Triton X-100 et 10% de glycérol) contenant des inhibiteurs de protéases (1 µg/mL de pepstatine A, 2 µg/mL d'aprotinine, 1 µg/mL de leupeptine, 0,2 mM de PMSF) et 1 mM de sodium ortho-vanadate. Les lysats ont été récoltés dans des microtubes et centrifugés à 13 000 x g pendant 10 min à 4°C. Par la suite, les surnageants ont été transférés dans de nouveaux microtubes et les protéines totales ont été dosées selon la méthode du BCA (acide bicinchoninique; Pierce).

2.6 Isolation de membranes cellulaires

L'isolation des membranes des CMLV a eu lieu à une confluence cellulaire de 80%. Après l'élimination de leur milieu de culture, les cellules ont été lavées à deux reprises avec le tampon A composé de 10 mM de NaHCO₃, 5 mM de NaN₃ (pH 7,0, 4°C) et des inhibiteurs de protéases (0,1 M de pefabloc, 1 mM de pepstatine, 1 mM de leupeptine et 0,1 mM d'aprotinine). Les cellules ont ensuite été incubées avec 4 mL de tampon A pendant 30 min à 4°C et récoltées dans des tubes de 50 mL en polycarbonate. La suspension cellulaire a été homogénéisée à trois reprises au polytron PowerGen 700 (Fisher Scientific) pendant 15 sec à 60% de la vitesse maximale et au potter verre/verre Tri-R Stir-R (Tri-R Instruments, Inc.). Une centrifugation (Sorvall®

Evolution RC, Mandel) a été réalisée à 34 541 x g pendant 30 min à 4°C. Le culot a été homogénéisé à l'aide du potter verre/verre dans 40 mL du tampon composé de 20 mM de Tris-Maléate (pH 6,8) et 0,6 M de KCl. Une deuxième centrifugation a été effectuée à 34 541 x g pendant 60 min à 4°C. Le nouveau culot a été resuspendu dans 40 mL de tampon Tris-HCl (10 mM, pH 7,4), homogénéisé au potter et une dernière centrifugation a été faite dans les mêmes conditions que la dernière. Le culot a finalement été homogénéisé dans 1 mL du tampon composé de 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4) et 2 mM d'EGTA. Les protéines membranaires ont ensuite été dosées selon la méthode du BCA (acide bicinchoninique; Pierce).

2.7 Immunobuvardage

Une quantité de 50 µg de protéines totales ou de membranes isolées a été resuspendue dans du tampon d'échantillons composé de 62,4 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 10% de glycérol, 2% de SDS, 5% de β-mercaptoéthanol et du bleu de bromophénol pour les études d'immunobuvardage. Les échantillons ont été incubés à 95°C pendant 5 min afin de dénaturer les protéines. Les différents échantillons ont migré sur un gel de 10% d'acrylamide/Bis (30% T, 2,67% C; BioRad) dans du tampon de migration (248 mM de Tris-base, 1,92 M de glycine et 1% de SDS) à 45 volts (V) pendant 16 h à la température de la pièce.

Un électrotransfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose a été effectué à 50 V pendant 3 h à 4°C dans un tampon de transfert composé de 192 mM de glycine et 24,8 mM de Tris-base. Les protéines transférées sur la membrane ont ensuite été fixées pendant 20 min dans une solution constituée de 40% de méthanol, 7% d'acide acétique glacial et 3% de glycérol. Pour vérifier le transfert des protéines du gel à la membrane, les protéines ont été colorées au rouge de Ponceau et décolorées par la suite dans du TBST-0,05%

(Tris buffered saline Tween-0,05%; 10 mM de Tris-base (pH 7,4), 150 mM de NaCl et 0,05% de Tween). Les sites non spécifiques de la membrane de nitrocellulose ont été bloqués à l'aide d'une solution de TBST contenant 5% de lait écrémé en poudre pendant 1 h à la température de la pièce avec agitation. La membrane a ensuite été exposée avec l'anticorps primaire durant 16 h à 4°C avec agitation. L'anticorps polyclonal dirigé contre le GHS-R1a de rat (Alpha Diagnostic International) a été utilisé à la dilution 1/200 (5 µg/mL) dans du TBST contenant 5% de lait et 0,02% de sodium azide. L'anticorps polyclonal dirigé contre la thréonine 185 et la tyrosine 187 phosphorylées des protéines ERK 1 et 2 (Biosource), celui dirigé contre les protéines ERK 1 et 2 totales (Biosource), celui dirigée contre la sérine 473 phosphorylée de Akt (Cell Signaling Technology) et celui dirigé contre Akt total (Cell Signaling Technology) ont été utilisés à la dilution 1/1000 dans du TBST contenant 5% de BSA (Sigma) et 0,02% de sodium azide. Finalement, un anticorps monoclonal dirigé contre la β -actine (Sigma) a été utilisé (dilution 1/5000 dans du TBST avec 5% de lait et 0,02% de sodium azide) afin de normaliser la quantité de protéines. Dans certains cas, une photographie de la membrane colorée au rouge Ponceau a été utilisée pour cet effet. Suite à l'incubation à l'anticorps primaire, la membrane a été lavée à 5 reprises pendant 5 min au TBST pour enlever l'excédent d'anticorps. Cette dernière a ensuite été incubée avec un anticorps secondaire couplé à la peroxidase pendant 1 h à la température de la pièce sous agitation. Pour les anticorps primaires de lapin, un anticorps de chèvre anti-lapin couplé à la peroxydase (Peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG; Jackson Immuno Research) a été utilisé à la dilution 1/5000 (concentration finale : 0,16 µg/mL) dans du TBST contenant 5% de lait. Pour les anticorps de souris, un anticorps de chèvre anti-souris couplé à la peroxydase (Stabilized Goat anti-mouse HRP-conjugated; Pierce) a été utilisé à la dilution 1/1000 (concentration finale : 0,01 µg/mL) dans une solution de TBST avec 5% de lait. Cinq autres lavages de 5 min au TBST ont suivi l'exposition de la membrane au second anticorps.

Les complexes protéines-anticorps ont ensuite été exposés à une solution de la trousse commerciale « ECL Plus Western Blotting Detection Reagents » (Amersham Biosciences) et détectés par chemiluminescence suite à une lecture au Typhoon 9410 (Amersham Biosciences). L'intensité des bandes obtenues a été analysée avec le logiciel ImageQuant™ v5.2 (Amersham Biosciences).

2.8 Immunoprécipitation et essai kinase

Suite aux stimulations des CMLV aux différents peptides, les protéines totales ont été extraites et dosées (protocole décrit précédemment). Tout d'abord, les protéines A Sépharose™ 6MB (Amersham Biosciences) ont été pré-couplées pendant 2 h à 4°C sous agitation avec 1 µg d'anticorps dirigé contre les protéines ERK1 et 2 (SM1; Dr Sylvain Meloche, Université de Montréal) dans un tampon composé de 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM de NaCl, 5 mM d'EDTA et 0,5% de Triton X-100 (TNET) et additionné de 1% de BSA. Les complexes protéines A Sépharose™-anticorps ont ensuite été lavés au TNET et incubés en présence de 350 µg de protéines totales pendant 4 h à 4°C sous agitation. Par la suite, les complexes protéines A Sépharose™-anticorps-protéines ont été lavés 3 fois au tampon de lyse conventionnel (décrit précédemment) et lavés une fois au tampon kinase (1X) composé de 20 mM d'Hepes, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT et 10 mM de PNPP. Aux complexes, 20 µL de tampon kinase 2X, 10 µL du substrat MBP (myelin basic protein; 1 µg/µL final) et 10 µL d'un mélange d'ATP ont été ajoutés pour la réaction d'essai kinase. Le mélange d'ATP était composé de 0,5 µCi/µL de ³²P-γ-ATP (PerkinElmer) et de 0,2 mM d'ATP froid (non radioactif). Les réactions d'essai kinase ont été incubées pendant 10 min à 30°C avec agitation et 10 µL de tampon d'échantillons (décrit plus haut) ont été ajoutés aux microtubes afin

d'arrêter la réaction. Ensuite, les échantillons ont été incubés pendant 5 min à 95°C et conservés à -20°C jusqu'au moment de l'électrophorèse.

Les échantillons ont migré sur un gel de 15% d'acrylamide/Bis (30% T; 2,67% C) à 200 V pendant 3 h à 4°C. Le gel a ensuite été coloré dans une solution de bleu de Coomassie (50% de méthanol, 10% d'acide acétique glacial et 0,05% de bleu de Coomassie R-250) pendant 30 min, décoloré dans une solution composée de 10% de méthanol et 10% d'acide acétique glacial et fixé dans une solution de 2% de glycérol pendant 15 min à la température de la pièce. Le gel a ensuite été séché entre deux membranes de cellophane (BioRad) dans l'appareil GelAir Dryer (BioRad) pendant 2 h, exposé dans la cassette PhosphorImager pendant 3 h et 30 min, révélé au Typhoon 9410 (Amersham Biosciences) et analysé avec le logiciel ImageQuant™ v5.2 (Amersham Biosciences). Les bandes du gel correspondant au substrat phosphorylé-radiomarqué ont été découpées et la radioactivité a été déterminée par comptage de scintillation liquide (3 mL) pendant 2 min à l'aide du compteur beta (1217 RackBeta Liquid Scintillation Counter, LKB Wallac, PerkinElmer). Les résultats en cpm ont été analysés sur un graphique à l'aide du logiciel GraphPad Prism 3,03.

2.9 Mesure du taux de synthèse d'ADN et protéique

Lors des expériences d'incorporation à la ³H-thymidine (synthèse d'ADN) et ³H-leucine (synthèse protéique), les CMLV (100 000 cellules/puits) ont été incubées pendant 16 h à 37°C (5% de CO₂). Chaque condition a été faite en triplicata. Les cellules ont ensuite été synchronisées dans un milieu de culture sans sérum (voir section 2.2) pendant 48 h à 37°C et 0,3 µCi/mL de méthyl-³H-thymidine (MP Biomedicals, Inc) ou de 0,5 µCi/mL de 4,5-³H-L-leucine (MP Biomedicals, Inc) ont été ajoutés aux cellules. Par la suite, les cellules ont été incubées aux différents peptides pendant 24 h à 37°C. Pour les expériences de

synthèse d'ADN, les cellules ont été stimulées avec des concentrations de 10^{-8} et 10^{-6} M de ghreline (seule ou en présence de 5 ng/mL de PDGF-BB ajoutés aux cellules une heure avant) ou de des-acyl ghreline. L'ang II (10^{-7} M) et le PDGF-BB (5 ng/mL) ont été utilisés comme contrôles négatif et positif, respectivement. Pour les expériences de synthèse protéique, les cellules ont été stimulées avec différentes concentrations de ghreline (10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} et 10^{-6} M) ou de des-acyl ghreline (10^{-7} M). L'ang II (10^{-7} M) a été utilisée comme contrôle positif en présence ou non d'irbézartan (10^{-6} M; antagoniste du récepteur AT1 de l'ang II), ajouté aux cellules 30 min avant le début des stimulations à l'ang II.

Après la stimulation des cellules, leur milieu a été aspiré et les cellules ont été incubées dans 500 μ L d'une solution de 5% d'acide trichloroacétique (TCA; Fisher Scientific) pendant 30 min sur la glace. Ensuite, les cellules ont été lavées une fois avec 500 μ L de la solution de TCA et 3 fois avec l'eau du robinet. Les puits ont été séchés en renversant les plaques. 500 μ L d'une solution de 0,1% de NaOH ont été ajoutés aux cellules et la solution a été récoltée dans un tube à scintillation. Les puits ont été rincés avec une seconde quantité de 500 μ L de la solution de NaOH, qui a été déposée dans le même tube à scintillation (selon la condition). La radioactivité a été déterminée par comptage de scintillation liquide (3 mL) pendant 5 min à l'aide du compteur beta (1217 RackBeta Liquid Scintillation Counter, LKB Wallac, PerkinElmer). Les résultats en cpm ont été analysés sur un graphique à l'aide du logiciel GraphPad Prism 3,03 et les statistiques ont été calculées par le logiciel GraphPad InStat.

3.0 Résultats

3.1 Expression du *GHS-R1a* dans les cellules musculaires lisses vasculaires

3.1.1 Optimisation de la méthode de RT-PCR pour le gène du *GHS-R1a*

Tout d'abord, il était important d'optimiser adéquatement les conditions de la méthode de RT-PCR pour le gène du récepteur de la ghreline afin d'analyser l'expression de ce gène au niveau des CMLV en culture.

Malgré la simplicité de la technique de RT-PCR classique, l'optimisation de la méthode pour le gène du *GHS-R1a* a été difficile. Au début de l'étude, seule la séquence partielle du gène chez la souris et le rat était disponible. Nos premières expériences étaient faussées puisque les amorces utilisées détectaient les deux sous-types du *GHS-R*, 1a et 1b. Par la suite, la découverte de la séquence complète du *GHS-R* nous a permis d'utiliser des amorces spécifiques à la forme 1a du *GHS-R*. Les amorces sens et anti-sens complémentaires aux séquences du gène doivent être positionnées sur les exons 1 et 2, respectivement (voir Figure 4), afin d'éviter l'amplification d'un fragment de PCR correspondant à la forme 1b du *GHS-R*. En effet, l'exon 2 n'est pas transcrit en ARNm du *GHS-R1b*. Il est ainsi impossible d'amplifier la forme 1b du *GHS-R*. Plusieurs paires d'amorces ont été testées pour amplifier le *GHS-R1a* par RT-PCR. Pour des raisons inconnues, la plupart de ces amorces utilisées amplifiaient plusieurs produits non spécifiques de PCR observés sur gel d'agarose, malgré l'augmentation de la température d'hybridation des amorces (lors du PCR). Une augmentation de la température d'hybridation des amorces engendre une diminution de l'amplification de produits non spécifiques de PCR au gène désiré. L'augmentation de la spécificité est due à une liaison plus stringente des amorces à la séquence

d'ADNc. Le meilleur résultat de PCR a été obtenu avec les amorces 5'-GAG ATC GCT CAG ATC AGC CAG TAC-3' (sens) et 5'-TAA TCC CCA AAC TGA GGT TCT GC-3' (anti-sens) (26) qui ont amplifié un seul et unique produit de PCR à 314 paires de bases, représentant le *GHS-R1a*. Avec ces amorces, nous avons optimisé les différents paramètres de la méthode de RT-PCR pour obtenir le meilleur signal possible de l'amplification du gène du *GHS-R1a*.

Pour l'optimisation de la méthode de RT-PCR, nous avons testé différentes concentrations de $MgCl_2$ (de 1,5 à 3,0 mM), différentes températures d'hybridation des amorces (60, 65 et 70°C) et différents nombres de cycles de PCR (20, 25, 30, 35 et 40 cycles). Le meilleur résultat de PCR a été obtenu avec les conditions suivantes : 2,0 mM de $MgCl_2$, une température d'hybridation à 65°C et 40 cycles de PCR. La figure 17A montre un produit d'amplification du gène *GHS-R1a* à partir de 35 cycles de PCR, mais le meilleur signal observé est à 40 cycles. Un nombre de plus de 40 cycles de PCR est rarement utilisé. Cette figure montre que les CMLV expriment le *GHS-R1a* à un niveau très faible, puisque 40 cycles de PCR sont nécessaires pour observer un signal. L'optimisation des paramètres de PCR a aussi été faite pour le contrôle interne *GAPDH*. À 30, 35 et 40 cycles, l'intensité du signal du *GAPDH* semble identique, donc saturée (figure 17A). Un programme de PCR de 25 cycles a donc été choisi pour le contrôle interne. Une réaction de transcription inverse sans transcriptase inverse (remplacée par de l'eau) a été réalisée pour chaque échantillon, nous assurant que les échantillons d'ARN total n'étaient pas contaminés par de l'ADN génomique (malgré un traitement à l'ADNase). En fait, si de l'ADN génomique avait été amplifié par la polymérase lors du PCR, nous aurions observé un produit de PCR avec un nombre de paires de bases de plus de 2 Kb, car les amorces auraient amplifiées l'intron situé entre les deux exons du gène.

Afin de confirmer l'optimisation de la méthode de RT-PCR pour le gène *GHS-R1a*, une stimulation des CMLV à différentes concentrations de LPS (0, 1, 10 et 100 ng/mL) pendant 4 h a été réalisée. En effet, Wu et collaborateurs ont montré que l'expression de l'ARNm du *GHS-R1a* dans les cellules musculaires lisses de rat est augmentée de 3, 6 et 5,9 fois après une stimulation aux LPS à 1, 10 et 100 ng/mL, respectivement (26). Nos résultats obtenus montrent également une augmentation de l'expression de l'ARNm du *GHS-R1a* suite à une stimulation des CMLV aux LPS (figure 17B). Des augmentations de 8,5, 10 et 4,2 fois sont observées pour des stimulations aux LPS à 1, 10 et 100 ng/mL, respectivement. L'expression du *GHS-R1a* dans les CMLV est maximale à 10 ng/mL de LPS, comme ce qui a été obtenu par l'équipe de Wu. Cette expérience confirme que la méthode de détection du *GHS-R1a* par RT-PCR est efficace et bien optimisée.

3.1.2 Détection du *GHS-R1a* dans les CMLV par RT-PCR

Suite à l'optimisation des paramètres de RT-PCR, nous avons comparé l'expression du *GHS-R1a* au niveau des CMLV avec d'autres types cellulaires, dont les GH3 (cellules tumorales hypophysaires) et les J774 (monocytes de souris) (figure 18A). Les cellules GH3 ont été utilisées comme un contrôle positif, puisque le *GHS-R1a* est très fortement exprimé au niveau de l'hypophyse. La figure 18A montre que l'expression du *GHS-R1a* dans les CMLV est plus élevée de 1,6 fois comparativement à celle dans les cellules GH3. L'expression du *GHS-R1a* a aussi été analysée dans un autre type cellule impliqué dans le développement de l'athérosclérose : les monocytes/macrophages. Le *GHS-R1a* ne semble pas être exprimé au niveau des monocytes de souris (J774).

3.1.3 Détection du GHS-R1a dans les CMLV par immunobuvardage

Nous avons démontré par RT-PCR que le *GHS-R1a* est exprimé dans les CMLV, mais le gène est-il traduit en protéines? Nous avons donc étudié la présence du GHS-R1a au niveau des protéines totales et membranaires des CMLV par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps dirigé contre une séquence peptidique de 20 acides aminés située dans la partie cytoplasmique C-terminale du GHS-R1a. Cette séquence n'est pas retrouvée dans le type 1b du GHS-R. La figure 18B montre que le récepteur de la ghreline (46 kDa) est plus abondant au niveau des protéines membranaires (de 1,2 fois) que totales, puisque pour une même quantité de protéines, le récepteur de la ghreline est plus concentré aux membranes que dans toute la cellule. Les protéines totales des cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes ont été utilisées comme contrôle négatif. À 46 kDa, aucune bande n'est observée. Cependant, plusieurs bandes non négligeables sont présentes à 42, 44, 60, 75 et 85 kDa. Les bandes à 42 et 44 kDa représentent probablement le GHS-R1a, avec des formes différentes de glycosylation. Comme contrôle positif, les protéines totales des cellules hypophysaires GH3 ont été utilisées, mais le récepteur de la ghreline n'est que très faiblement présent contrairement aux CMLV (0,08 fois vs protéines totales des CMLV), malgré son expression par RT-PCR.

3.2 Effet *in vitro* de la ghreline et de la des-acyl ghreline sur différentes voies de signalisation dans les cellules musculaires lisses vasculaires

Nous avons montré que le GHS-R1a est exprimé dans les CMLV, ce qui suggère que la ghreline joue un rôle au niveau de ces cellules. Au cours du développement de l'athérosclérose, les CMLV vont proliférer. Plusieurs études ont montré que la ghreline stimule la prolifération de différents types cellulaires via l'activation de deux voies de signalisation, les voies de MAPK (ERK1/2) et

de PI3 kinase/Akt (41;48;49;52;199;202). Avant d'évaluer l'effet de la ghreline sur la prolifération des CMLV, nous avons tout d'abord étudié l'activation de ces deux voies par la ghreline dans les CMLV. L'action de la des-acyl ghreline sur les CMLV a aussi été évaluée, la forme non octanoylée de la ghreline qui n'a pas d'affinité pour le GHS-R1a (86).

3.2.1 Activation de la voie de ERK1/2 par la ghreline et la des-acyl ghreline dans les CMLV

La voie de la MAPK ERK1/2, une kinase sérine/thréonine, est activée par une variété de signaux extracellulaires, dont les facteurs de croissance, les hormones et les cytokines. L'activation de cette voie contrôle la transcription de plusieurs gènes impliqués, entre autres, dans la prolifération et la survie cellulaire (77). Il a été rapporté que la ghreline active cette voie par exemple dans les cellules GH3 (48) et les 3T3-L1 (41), menant à la prolifération cellulaire. Nous avons donc étudié la capacité de la ghreline à activer la voie de signalisation de ERK1/2 en mesurant la phosphorylation des résidus thréonine 185 et tyrosine 187 de ERK1/2 par immunobuvardage. Des stimulations des CMLV à la ghreline (100 nM) pendant 2, 5, 10 et 30 min augmentent la phosphorylation de ERK1/2, sans affecter les protéines ERK1/2 totales (figure 19A). La phosphorylation maximale a lieu après une stimulation de 10 min à la ghreline, soit une hausse de 32,7 et de 4,6 comparativement au véhicule pour les protéines ERK 1 et 2, respectivement. L'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 induite par la ghreline est semblable à celle médiée par l'ang II (37,0 et 4,3 fois). Pour vérifier si l'effet observé par la ghreline passe par le GHS-R1a, l'action de la des-acyl ghreline, qui n'a pas d'affinité pour le GHS-R1a, a été évaluée suite à des stimulations des CMLV à la des-acyl ghreline (100 nM) à différents temps (2, 5, 10 et 30 min). La des-acyl ghreline augmente la phosphorylation de ERK1/2 (19,1 et 4,5 fois) de façon maximale à 10 min de stimulation (figure 19A), comparable à l'action de la

ghrelina. Ces résultats suggèrent que la ghrelina et la des-acyl ghrelina activent la voie de ERK1/2 dans les CMLV via probablement un récepteur distinct du GHS-R1a.

Puisque la phosphorylation de ERK1/2 n'est qu'un reflet indirect de son activité, l'activation de la voie de ERK1/2 par la ghrelina a aussi été étudiée par des essais kinases *in vitro*, permettant de quantifier l'activité phosphotransférase de ERK1/2 sur le substrat MBP (myelin basic protein), qui sera radiomarqué une fois phosphorylé. La stimulation des CMLV à la ghrelina (100 nM) pendant 15 min augmente l'activité phosphotransférase de ERK1/2 de 1,8 fois le véhicule (figure 19B). Quant à la des-acyl ghrelina, elle ne stimule que de 1,3 fois l'activité de ERK1/2 à 15 min de stimulation (figure 19B), suggérant que la stimulation de la voie de ERK1/2 induite par la ghrelina passerait probablement par l'activation du GHS-R1a. Contrairement aux résultats obtenus des expériences d'immunobuvardage, l'augmentation de l'activité phosphotransférase de ERK1/2 est beaucoup moins marquée par une stimulation des CMLV à l'ang II (2,3 fois vs 37,0 fois), mettant ainsi en doute les résultats obtenus avec la ghrelina et la des-acyl ghrelina. Malgré que l'essai kinase soit le reflet direct de l'activation de la voie de ERK1/2, les résultats de la phosphorylation de ERK1/2 par immunobuvardage devraient être considérés. Nous avons donc montré pour la première fois que la ghrelina et la des-acyl ghrelina activent la voie de ERK1/2 dans les CMLV via probablement un récepteur distinct du GHS-R1a.

3.2.2 Activation de la voie de PI3 kinase/Akt par la ghrelina et la des-acyl ghrelina dans les CMLV

Akt est une kinase sérine/thréonine qui joue un rôle critique dans la survie cellulaire, en plus de stimuler la croissance et la prolifération des cellules. La voie de Akt, qui implique l'activation en amont de PI3 kinase, est

stimulée par différents facteurs de survie et de croissance (80). Il a été rapporté dans la littérature que la ghreline active la prolifération des cellules d'adénocarcinomes pancréatiques (49) et des pré-adipocytes (3T3-L1) (41) via la voie de PI3 kinase/Akt. Cette voie est aussi stimulée par la ghreline et la des-acyl ghreline en situation de survie cellulaire dans les cardiomyocytes (H9c2) (203). Nous avons donc étudié dans les CMLV la capacité de la ghreline à activer la voie de PI3 kinase/Akt en mesurant la phosphorylation de la sérine 473 de Akt par immunobuvardage. Des stimulations à la ghreline (100 nM) ou à la des-acyl ghreline (100 nM) pendant 2, 5, 10 et 30 min ont montré une augmentation de la phosphorylation de Akt (figure 20A). L'effet est maximal à 10 et 5 min de stimulation à la ghreline et à la des-acyl ghreline, respectivement. La protéine totale Akt est constante dans la plupart des conditions. Une diminution de Akt total est cependant observée pour la stimulation au PDGF, suggérant que Akt total est partiellement dégradé. L'activation de la voie de Akt est confirmée par un prétraitement de 30 min à un inhibiteur de PI3 kinase, LY294002 (30 μ M), lequel inhibe l'augmentation de la phosphorylation induite par les deux formes de ghreline (figure 20B). Cette expérience montre que la ghreline et la des-acyl ghreline activent la voie de PI3 kinase/Akt dans les CMLV via probablement un récepteur différent du GHS-R1a.

3.2.3 La voie de PI3 kinase/Akt est impliquée dans l'activation de la voie de ERK1/2 en réponse à la ghreline et à la des-acyl ghreline dans les CMLV

Nous avons montré par les expériences précédentes que la ghreline et la des-acyl ghreline stimulent les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2 au niveau des CMLV. Puisque ces deux voies sont connues pour stimuler la prolifération de certains types cellulaires, une interrelation serait-elle possible entre ces voies? Certaines études ont montré que l'activation de la voie de ERK1/2

pouvait être dépendante de PI3 kinase/Akt. Par exemple, il a été rapporté dans la littérature que les LDL oxydés, qui contribuent à la progression de l'athérosclérose, stimulent la prolifération des CMLV via l'activation de PI3 kinase/Akt/MEK/ERK (267). Une interrelation est donc possible entre les voies PI3 kinase/Akt et Ras/Raf/MEK/ERK dans les CMLV. Afin de vérifier si cette relation existe en réponse à la ghreline ou à la des-acyl ghreline dans les CMLV, un prétraitement des cellules de 30 min a été réalisé avec un inhibiteur pharmacologique de PI3 kinase, LY294002. LY294002 (30 μ M) inhibe complètement la phosphorylation de ERK1/2 induite par la ghreline (100 nM) ou la des-acyl ghreline (100 nM) dans les CMLV suite à une stimulation de 10 min (figure 21A). Ce résultat suggère que l'activation de la MAPK ERK1/2 a lieu principalement par PI3 kinase, directement ou indirectement, suite à la stimulation des CMLV à la ghreline et à la des-acyl ghreline.

La kinase PI3 agit en amont de la protéine kinase Akt, laquelle est active une fois phosphorylée. Cependant, Akt n'est pas la seule voie que PI3 kinase peut activer. Il est connu que PI3 kinase peut également stimuler la voie de ERK1/2 en activant la protéine Ras (340;341). Pour mieux définir la voie utilisée par PI3 kinase pour activer ERK1/2 dans les CMLV suite à une stimulation à la ghreline ou à la des-acyl ghreline (10 min), nous avons prétraité pendant 30 min les cellules avec un inhibiteur de Akt, SH-5. Cet inhibiteur, un analogue phosphatidylinositol, inhibe l'activation de Akt en diminuant sa phosphorylation, sans affecter le niveau total de protéines (342). La présence de SH-5 inhibe presque totalement la phosphorylation de ERK1/2 médiée par la ghreline ou la des-acyl ghreline dans les CMLV, sans affecter les protéines totales (figure 21B). L'action de l'inhibiteur de Akt est confirmée par l'inhibition de la phosphorylation de Akt suite à une stimulation aux peptides (figure 21B). Au cours de cette expérience, l'inhibiteur de PI3 kinase, LY294002, a été utilisé comme contrôle positif. Nous avons donc montré que l'activation de ERK1/2 par la ghreline et la des-acyl ghreline dans les CMLV passe principalement par

la voie de PI3 kinase/Akt. Cependant, ces résultats ne nous mentionnent pas si l'action de la protéine Akt sur ERK1/2 est directe ou indirecte.

Le PDGF, un facteur de croissance, stimule la prolifération des CMLV en activant entre autres les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2 (259). Dans nos expériences, nous avons utilisé ce peptide comme contrôle positif. Un prétraitement des CMLV à l'inhibiteur de PI3 kinase, LY294002, réduit la phosphorylation de Akt induite par le PDGF alors que l'inhibiteur de Akt, SH-5, n'a pas d'effet. Cette observation peut peut-être s'expliquer par un manque d'efficacité de l'inhibiteur dû à la forte action du PDGF sur la phosphorylation de Akt. Contrairement aux autres conditions, la protéine totale Akt est réduite suite à des stimulations au PDGF, suggérant que la protéine Akt est dégradée. De plus, un prétraitement des CMLV aux inhibiteurs de PI3 kinase et de Akt n'affecte pas la phosphorylation de ERK1/2 induite par le PDGF, suggérant l'absence d'interrelation entre ces deux voies suite à une stimulation des CMLV au PDGF. Au niveau de ce type cellulaire, la transduction du signal par la ghreline et la des-acyl ghreline n'a pas le même profil que celui du PDGF.

3.3 Effet de la ghreline et de la des-acyl ghreline sur la prolifération cellulaire des cellules musculaires lisses vasculaires

3.3.1 Effet de la ghreline et de la des-acyl ghreline sur la synthèse d'ADN des CMLV

Nos résultats ont montré que la ghreline et la des-acyl ghreline activent les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2, lesquelles sont interreliées dans les CMLV. Plusieurs études ont rapporté que la ghreline (41;48;49;52;199;202) ainsi que la des-acyl ghreline (48) activent ces voies, menant à une prolifération cellulaire. Pour vérifier un effet prolifératif de la ghreline et de la des-acyl

ghrelina sur les CMLV, des expériences d'incorporation à la ^3H -thymidine ont été réalisées pour mesurer le taux de synthèse d'ADN. Aucune augmentation significative de l'incorporation à la ^3H -thymidine n'est observée comparativement au véhicule suite à des stimulations des CMLV à la ghrelina (10^{-8} et 10^{-6} M) pendant 24 h (figure 22A). Le même résultat est observé avec une stimulation à la des-acyl ghrelina (10^{-8} et 10^{-6} M). Malgré une activation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, la ghrelina et la des-acyl ghrelina ne stimulent pas la synthèse d'ADN dans les CMLV, comparable à l'action de l'ang II qui est utilisé comme contrôle négatif.

Durant le développement de l'athérosclérose, plusieurs molécules sont surexprimées au niveau de la paroi vasculaire ou de la région subendothéliale en réponse à des stimuli du processus inflammatoire. C'est le cas du PDGF qui est produit par les plaquettes, les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires. Entre autres, le PDGF stimule la prolifération des CMLV au cours de la formation des plaques athérosclérotiques (260). Les résultats précédents montrent que la ghrelina n'a pas d'effet sur la synthèse d'ADN des CMLV, mais comment agit-elle en présence d'un marqueur athérosclérotique, comme le PDGF? Une stimulation simultanée des CMLV à la ghrelina (10^{-8} et 10^{-6} M) et au PDGF (5 ng/mL) pendant 24 h ne module pas de façon significative la synthèse d'ADN, comparativement à une stimulation au PDGF (figure 22A). Aucun effet synergique ou additif n'est observé sur l'action du PDGF au niveau de la prolifération cellulaire des CMLV en présence de ghrelina. Cependant, d'autres molécules impliquées dans la pathologie d'athérosclérose pourraient provoquer un effet synergique de la prolifération cellulaire en présence de ghrelina. Des études supplémentaires devront être réalisées.

3.3.2 Effet de la ghrelina et de la des-acyl ghrelina sur la synthèse protéique des CMLV

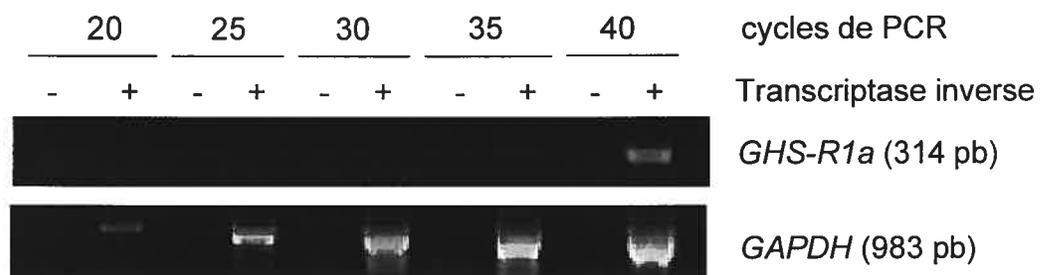
L'ang II, l'effecteur du système rénine-angiotensine, joue un rôle important au niveau des CMLV au cours de l'athérosclérose. Ce peptide amorce plusieurs réponses dans les CMLV qui mènent à l'hypertrophie, la prolifération et la migration des cellules. L'ang II est un agent non hyperplasique, mais hypertrophique qui stimule la synthèse protéique des CMLV, entre autres en activant la voie des MAPK (229). Nous avons montré précédemment que la ghrelina et la des-acyl ghrelina ne stimulent pas l'hyperplasie des CMLV. Les deux formes de ghrelina stimulent-elles la synthèse protéique des CMLV comparable à l'action de l'ang II? Pour vérifier un effet hypertrophique de la ghrelina et de la des-acyl ghrelina sur les CMLV, des expériences d'incorporation à la ^3H -leucine ont été effectuées pour mesurer le taux de synthèse protéique. Des stimulations des cellules à la ghrelina à différentes concentrations (10^{-11} à 10^{-6} M) pendant 24 h n'ont aucun effet significatif sur la synthèse protéique des CMLV (figure 22B). Ce même résultat est également obtenu par une stimulation des cellules à la des-acyl ghrelina (10^{-7} M). L'ang II a été utilisé comme contrôle positif, dont l'action est inhibée complètement par l'irbésartan (10^{-6} M), un antagoniste de son récepteur AT1. Contrairement à l'ang II, la ghrelina et la des-acyl ghrelina ne sont pas des agents hypertrophiques des CMLV.

Figure 17 : Optimisation de la méthode de RT-PCR pour la détection de l'expression de *GHS-R1a* dans les CMLV

A) Optimisation du nombre de cycles de RT-PCR pour évaluer l'expression du *GHS-R1a* et du contrôle interne *GAPDH*. L'ARN total (0,5 µg) de CMLV a été utilisé comme matrice dans une réaction de polymérisation avec la réverse transcriptase Transcriptor. L'ADNc produit a par la suite été amplifié dans une réaction de PCR avec la Taq DNA polymérase. Différents nombres de cycles ont été testés afin que le signal des deux gènes exprimés dans les CMLV ne soit pas saturé. Pour le *GHS-R1a* (314 pb), 40 cycles ont donné un signal optimal tandis que pour le *GAPDH* (983 pb), il est de 25 cycles. Un contrôle négatif a été utilisé pour chaque échantillon, représentant une réaction de RT sans transcriptase inverse (remplacée par de l'eau). Les échantillons ont migré sur un gel d'agarose 2%. Les produits de PCR ont été visualisés par coloration au bromure d'éthidium.

B) Confirmation de l'optimisation du RT-PCR du *GHS-R1a*. Les CMLV ont été stimulées avec différentes concentrations de LPS (0, 1, 10 et 100 ng/mL) pendant 4 h à 37°C et l'ARN total a été extrait. Un RT-PCR a été réalisé sur chaque échantillon selon les paramètres optimisés suivants : 2,0 mM de MgCl₂, une température d'hybridation des amorces de 65°C et 40 cycles de PCR. Les produits de PCR ont migré sur un gel d'agarose 2% et ont été visualisés par coloration au bromure d'éthidium. L'intensité des bandes a été analysée avec le logiciel ImageQuant™ v5.2 et le ratio de l'intensité du signal de *GHS-R1a* sur celle de *GAPDH* est illustré sur le graphique. Un contrôle négatif a été utilisé pour chaque échantillon, représentant une réaction de RT sans transcriptase inverse (remplacée par de l'eau).

A



B

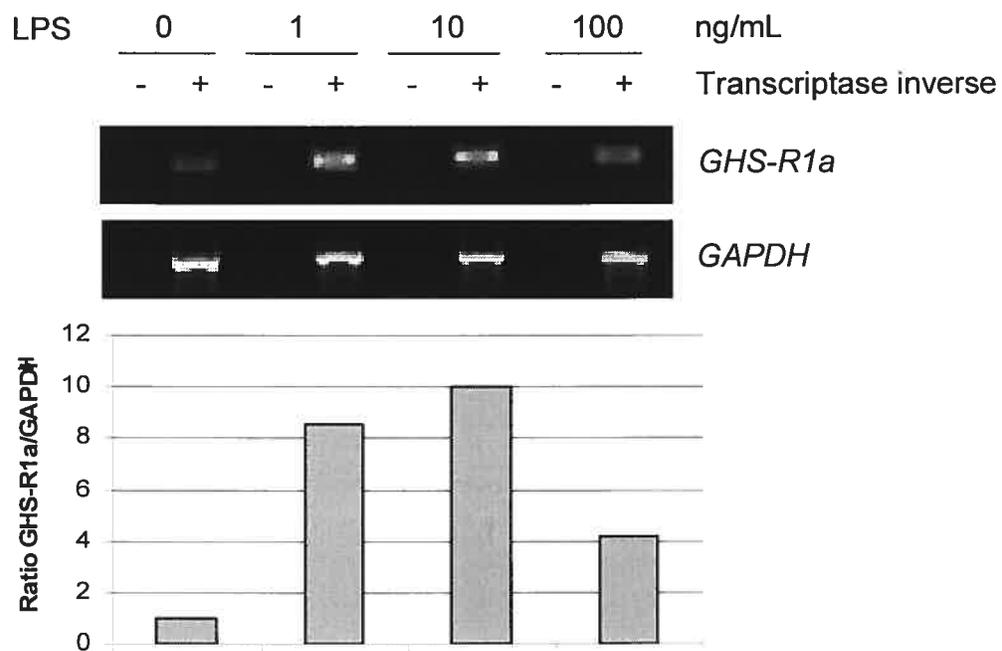
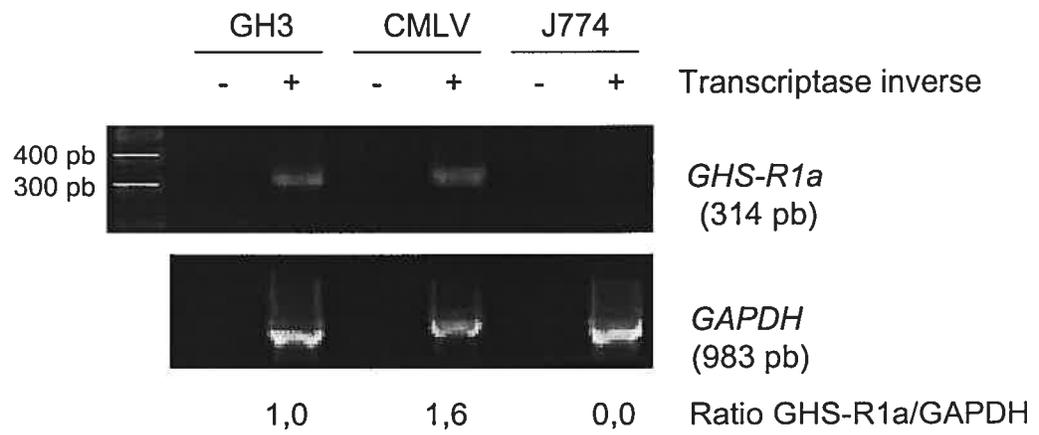


Figure 18: Expression du *GHS-R1a* par RT-PCR et détection de la protéine par immunobuvardage dans les CMLV

A) Expression du *GHS-R1a* par RT-PCR dans les CMLV, les cellules GH3 et J774. L'ARN total (0,5 µg) des CMLV a été isolé et l'expression du *GHS-R1a* a été détectée par RT-PCR. Le *GAPDH* a été utilisé comme contrôle interne. Les produits de PCR ont migré sur un gel d'agarose 2% et ont été visualisés par coloration au bromure d'éthidium. L'intensité des bandes a été analysée avec le logiciel ImageQuant™ v5.2. Le ratio représente l'intensité du signal de *GHS-R1a* sur celle de *GAPDH*. Un contrôle négatif a été utilisé pour chaque échantillon, représentant une réaction de RT sans transcriptase inverse (remplacée par de l'eau).

B) Présence de la protéine du GHS-R1a par immunobuvardage dans les CMLV, les cellules GH3 (contrôle positif) et 3T3-L1 différenciés en adipocytes (contrôle négatif). Une quantité de 50 µg de protéines totales ou membranaires (dans le cas des CMLV) de chaque type cellulaire a été soumise à un SDS-PAGE sur un gel d'acrylamide de 10%. Un anticorps polyclonal dirigé contre le GHS-R1a (46 kDa) de rat a été utilisé pour détecter la présence du GHS-R1a dans les cellules après un électrotransfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose. L'intensité des bandes a été analysée avec le logiciel ImageQuant™ v5.2.

A



B

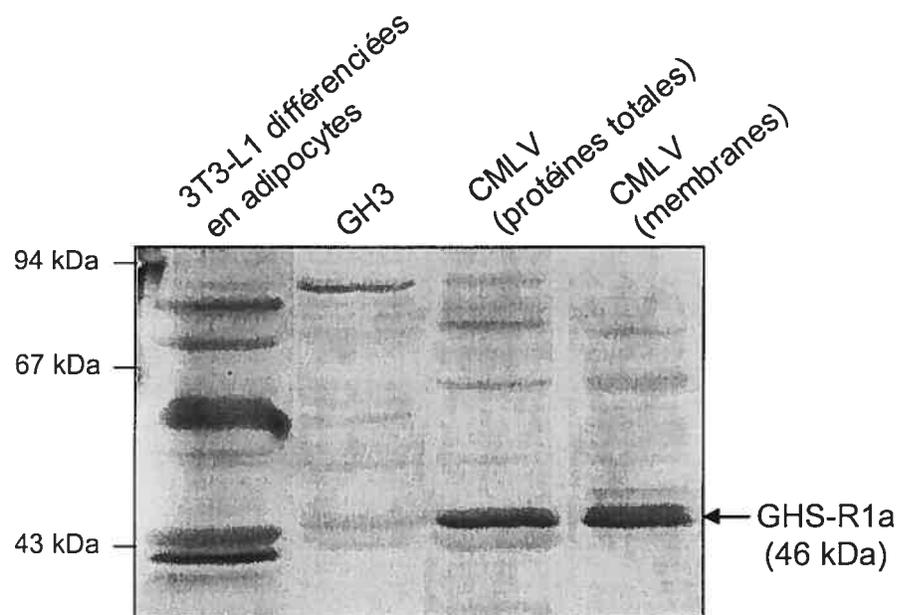


Figure 19 : Activation de la voie de ERK1/2 par la ghreline et la des-acyl ghreline dans les CMLV

A) Effet de la ghreline et de la des-acyl ghreline sur la phosphorylation des protéines ERK 1 et 2 dans les CMLV par immunobuvardage. Les cellules ont été stimulées à différents temps (2, 5, 10 et 30 min) à la ghreline (100 nM) ou à la des-acyl ghreline (100 nM) et les protéines totales ont été extraites. Une quantité de 50 µg de protéines a été soumise à un SDS-PAGE sur un gel d'acrylamide de 10%. Deux anticorps polyclonaux, l'un dirigé contre les protéines ERK1/2 phosphorylées (44 et 42 kDa) et l'autre dirigé contre les protéines ERK1/2 totales, ont été utilisés suite à un électrotransfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose. Des stimulations au PDGF-BB (50 ng/mL) et à l'ang II (100 nM) pendant 10 min ont été effectuées comme contrôles positifs. Une coloration au rouge Ponceau montre que la quantité de protéines déposée sur gel est approximativement égale. L'intensité des bandes a été analysée avec le logiciel ImageQuant™ v5.2. Le ratio représente l'intensité des bandes des protéines phosphorylées sur celle des protéines totales. L'expérience a été faite deux fois.

B) Effet de la ghreline et de la des-acyl ghreline sur l'activité de ERK1/2 dans les CMLV par essai kinase *in vitro*. Les cellules ont été stimulées à la ghreline (100 nM) ou à la des-acyl ghreline (100 nM) durant différents temps (5, 15 et 30 min). Les protéines totales ont ensuite été extraites et les protéines ERK1/2 ont été immunoprécipitées. L'essai kinase *in vitro* a eu lieu en présence des protéines ERK1/2 immunoprécipitées, du substrat MBP (1 µg/µL), de ³²P-γ-ATP (0,5 µCi/µL) et d'ATP froid (0,2 mM) pendant 10 min à 30°C. Les échantillons ont ensuite été soumis à un SDS-PAGE sur un gel d'acrylamide de 15%. Le gel coloré au bleu de Coomassie et séché a été analysé par PhosphorImager (Amersham Biosciences). Les bandes correspondant au substrat radiomarqué ont été découpées et la radioactivité a été déterminée par

comptage de scintillation liquide. Les résultats en cpm sont présentés sur le graphique. Une stimulation des cellules à l'ang II (100 nM) pendant 5 min représente le contrôle positif. Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes effectuées. Véh. : véhicule.

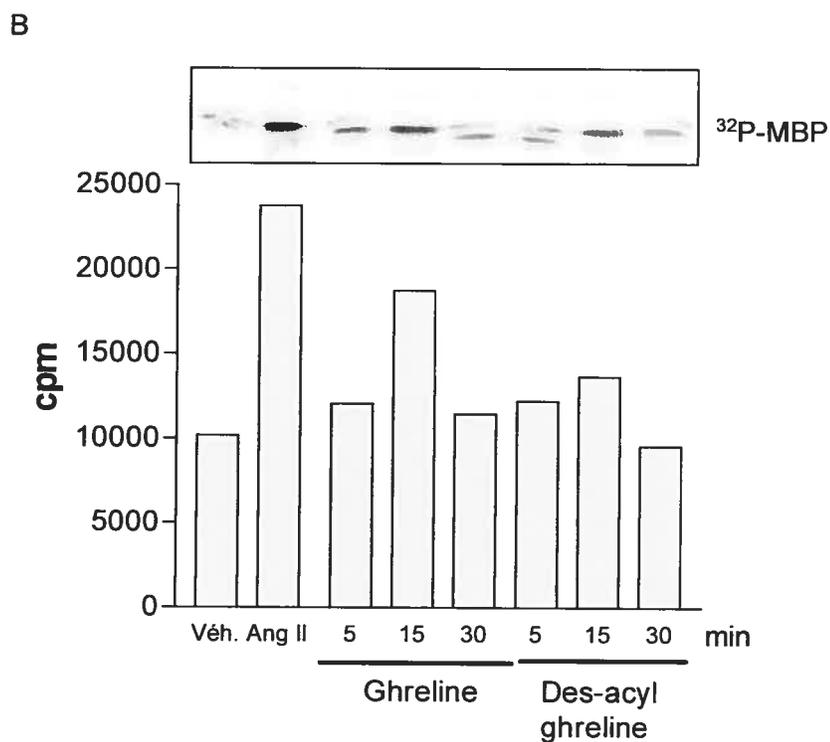
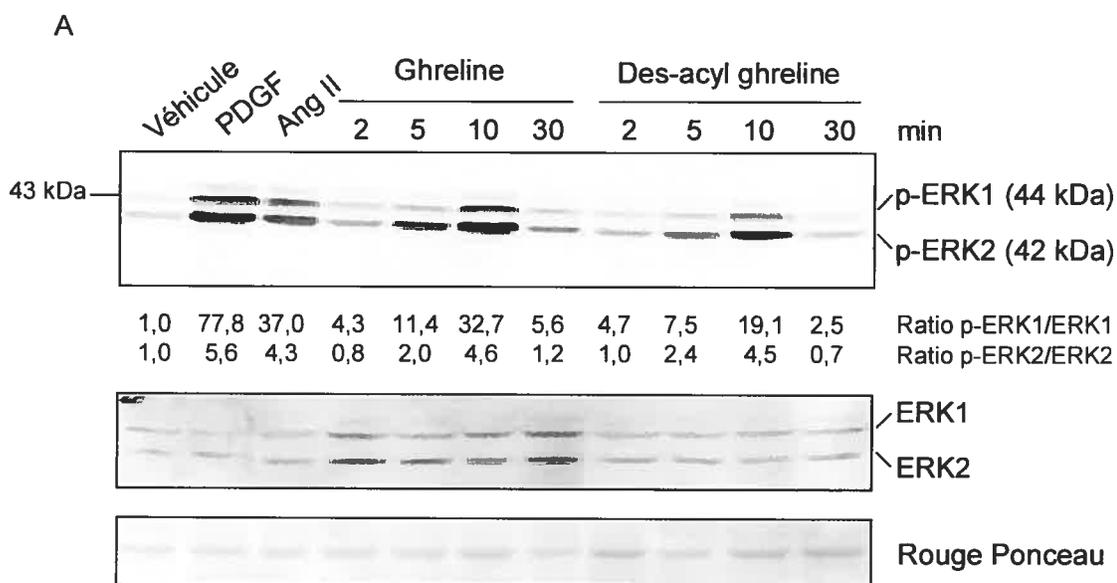
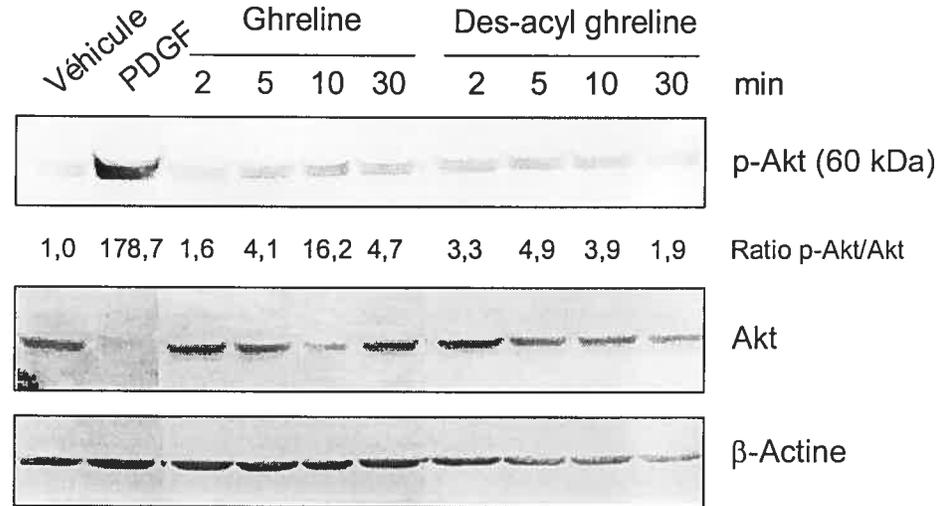


Figure 20 : Activation de la voie de PI3 kinase/Akt par la ghreline et la des-acyl ghreline dans les CMLV

A) Phosphorylation de Akt par la ghreline et la des-acyl ghreline dans les CMLV. Les CMLV ont été stimulées à la ghreline (100 nM) ou à la des-acyl ghreline (100 nM) à différents temps (2, 5, 10 et 30 min). Les protéines totales ont été extraites et une quantité de 50 µg de protéines a été soumise à un SDS-PAGE sur un gel d'acrylamide de 10%. Deux anticorps polyclonaux, l'un dirigé contre la protéine Akt phosphorylée (60 kDa) et l'autre dirigé contre la protéine Akt totale ont été utilisés suite à un électrotransfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose. Une stimulation des cellules a été faite avec le PDGF-BB (50 ng/mL) pendant 10 min comme contrôle positif. Un anticorps dirigé contre la β -actine a été utilisé pour montrer que la quantité de protéines déposée sur gel est approximativement égale. L'intensité des bandes a été analysée avec le logiciel ImageQuant™ v5.2. Le ratio représente l'intensité des bandes des protéines phosphorylées sur celle des protéines totales. Cette expérience a été faite trois fois.

B) La phosphorylation de Akt induite par la ghreline et la des-acyl ghreline est inhibée par un inhibiteur pharmacologique de PI3 kinase, LY294002, dans les CMLV. Les CMLV ont été prétraitées pendant 30 min avec un inhibiteur de PI3 kinase, LY294002 (30 µM), et stimulées ensuite à la ghreline (100 nM) ou à la des-acyl ghreline (100 nM) pendant 10 min. Les mêmes conditions d'immunobuvardage qu'en A ont été utilisées. Cette expérience a été faite trois fois.

A



B

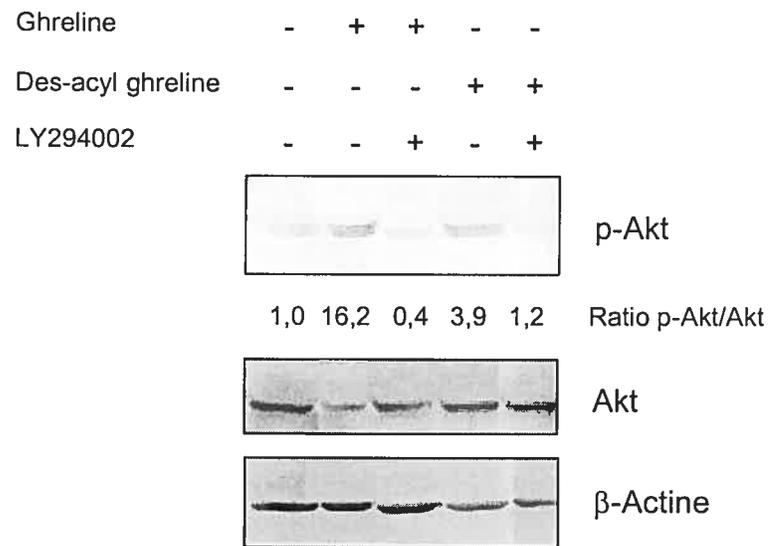


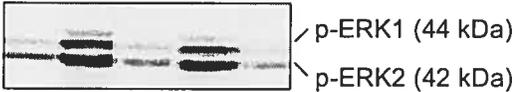
Figure 21 : Interrelation entre les voies de PI3 kinase/Akt et ERK1/2 suite à une stimulation des CMLV à la ghreline et à la des-acyl ghreline

A) La phosphorylation de ERK1/2 induite par la ghreline et la des-acyl ghreline est inhibée par un inhibiteur pharmacologique de PI3 kinase, LY294002. Les CMLV ont été prétraitées pendant 30 min avec un inhibiteur de PI3 kinase, LY294002 (30 μ M), et stimulées ensuite à la ghreline (100 nM) ou à la des-acyl ghreline (100 nM) pendant 10 min. Les protéines totales ont été extraites et une quantité de 50 μ g de protéines a été soumise à un SDS-PAGE sur un gel d'acrylamide de 10%. Deux anticorps polyclonaux, l'un dirigé contre les protéines ERK1/2 phosphorylées et l'autre dirigé contre les protéines ERK1/2 totales, ont été utilisés suite à un électrotransfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose. Une coloration au rouge Ponceau montre que la quantité de protéines déposée sur gel est approximativement égale. L'intensité des bandes a été analysée avec le logiciel ImageQuant™ v5.2. Le ratio représente l'intensité des bandes des protéines phosphorylées sur celle des protéines totales. L'expérience a été faite deux fois.

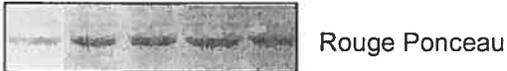
B) La phosphorylation de Akt et de ERK1/2 induite par la ghreline et la des-acyl ghreline est inhibée par un inhibiteur pharmacologique de Akt, SH-5. Les CMLV ont été prétraitées pendant 30 min avec un inhibiteur de Akt, SH-5 (10 μ M), et stimulées ensuite à la ghreline (100 nM) ou à la des-acyl ghreline (100 nM) pendant 10 min. Les mêmes conditions d'immunobuvardage qu'en A ont été utilisées, en plus de l'utilisation d'anticorps dirigés contre la protéine Akt phosphorylée et totale. Un prétraitement des CMLV au LY294002 (30 μ M) pendant 30 min et une stimulation au PDGF (50 ng/mL) pendant 10 min ont servi de contrôles positifs. Un anticorps dirigé contre la β -actine a été utilisé pour normaliser la quantité de protéines déposée sur gel. L'expérience a été faite une fois.

A

Ghreline	-	+	+	-	-
Des-acyl ghreline	-	-	-	+	+
LY294002	-	-	+	-	+

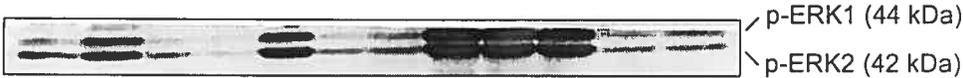


1,0	32,7	2,0	19,1	0,1	Ratio p-ERK1/ERK1
1,0	4,6	0,6	4,5	0,2	Ratio p-ERK2/ERK2



B

		Ghreline			Des-acyl ghreline			PDGF				
SH-5	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
LY294002	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-



1,0	3,9	0,2	0	6,1	0,1	0,6	3,8	5,7	6,8	0,9	0,7	Ratio p-ERK1/ERK1
1,0	2,4	0,5	0,02	3,0	0,3	0,4	1,6	1,8	2,0	0,4	0,3	Ratio p-ERK2/ERK2



1,0	2,1	0,2	0,9	2,8	0,3	1,1	41,7	2,2	56,9	0,3	0,7	Ratio p-Akt/Akt
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	-----	------	-----	-----	-----------------

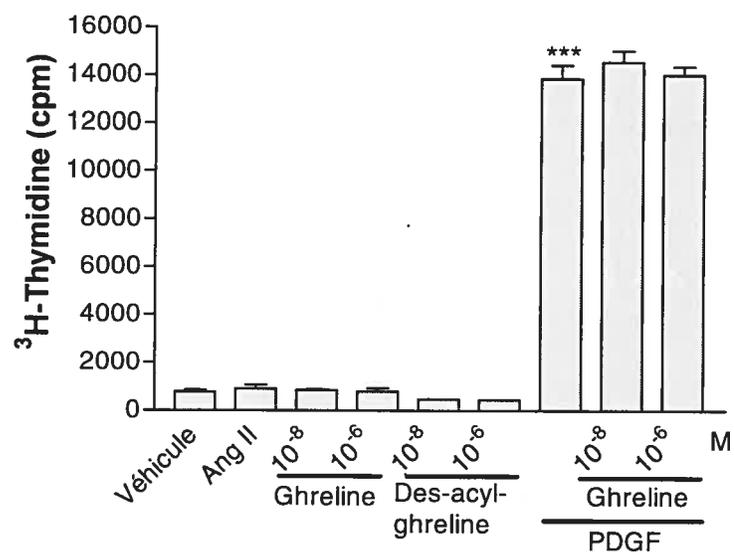


Figure 22 : Effet de la ghrelina et de la des-acyl ghrelina sur la prolifération des CMLV

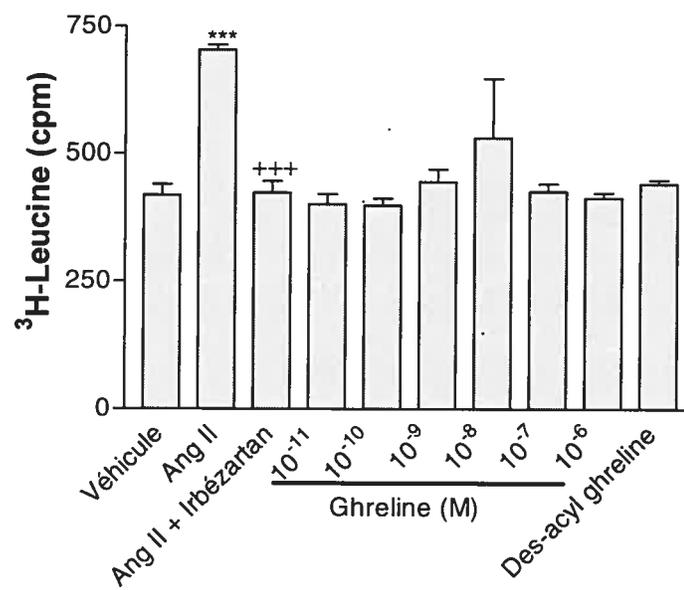
A) Effet de la ghrelina et de la des-acyl ghrelina sur le taux de synthèse d'ADN des CMLV. Les cellules ont été stimulées à la ghrelina (10^{-8} et 10^{-6} M) ou à la des-acyl ghrelina (10^{-8} et 10^{-6} M) pendant 24 h en présence de ^3H -thymidine (0,3 $\mu\text{Ci/mL}$). L'incorporation de ^3H -thymidine à l'ADN nouvellement synthétisé dans les cellules a été mesurée par comptage de scintillation liquide au compteur β (résultats en cpm). L'ang II (10^{-7} M) et le PDGF-BB (5 ng/mL) ont été utilisés comme contrôles négatif et positif respectivement. Une stimulation simultanée des CMLV à la ghrelina et au PDGF-BB (marqueur athérosclérotique) a été réalisée pour observer l'effet de la ghrelina sur le taux de synthèse d'ADN des CMLV en situation d'athérosclérose. N=3 pour cette expérience, mais elle est représentative de 11 expériences indépendantes. *** $p < 0,001$ vs véhicule.

B) Effet de la ghrelina et de la des-acyl ghrelina sur le taux de synthèse protéique des CMLV. Les CMLV ont été stimulées à la ghrelina (10^{-11} à 10^{-6} M) ou à la des-acyl ghrelina (10^{-7} M) pendant 24 h en présence de ^3H -leucine (0,5 $\mu\text{Ci/mL}$). L'incorporation de ^3H -leucine aux nouvelles protéines synthétisées dans les cellules a été mesurée par comptage de scintillation liquide au compteur β (résultats en cpm). L'ang II (10^{-7} M) a été utilisée comme contrôle positif et l'irbésartan (10^{-6} M), un antagoniste du récepteur AT1, a été employé pour inhiber l'effet de l'ang II. N=3 pour cette expérience, mais elle est représentative de 2 expériences indépendantes. *** $p < 0,001$ vs véhicule et +++ $p < 0,001$ vs Ang II.

A



B



4.0 Discussion

Au cours de cette étude, nous avons montré pour la première fois que la ghreline et la des-acyl ghreline jouent un rôle au niveau des CMLV en activant *in vitro* les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2, lesquelles sont interreliées. Cependant, l'activation de ces voies induite par les deux formes de ghreline ne stimule pas la prolifération *in vitro* des CMLV et semble passer via un récepteur distinct du GHS-R1a, malgré une expression du récepteur dans les cellules.

4.1 Expression du GHS-R1a dans les CMLV

Nos études préliminaires sur la distribution de l'expression du *GHS-R1a* par RT-PCR ont montré que le *GHS-R1a* est exprimé dans les CMLV, cellules qui migrent et prolifèrent au cours du développement des plaques athérosclérotiques. L'expression du *GHS-R1a* au niveau des CMLV a récemment été confirmée par une seconde équipe (26). Les conditions de RT-PCR pour évaluer l'expression de *GHS-R1a* dans les CMLV ont été optimisées afin d'obtenir un signal clair et reproductible sur gel d'agarose (exemple d'optimisation du nombre de cycles: figure 17A). L'optimisation n'a pas été très facile compte tenu de la faible expression du gène. Le choix des amorces est une étape importante, surtout dans le cas du *GHS-R1a*. Un mauvais choix des amorces peut occasionner l'amplification de la forme 1b du récepteur qui est tronquée, ubiquitaire et qui est non fonctionnel selon les études jusqu'à présent (9;13;19). Les deux sous-types de GHS-R, 1a et 1b, dérivent du même gène par épissage alternatif (9). Brièvement, le gène du *GHS-R* est composé de deux exons séparés par un intron. Les exons 1 et 2 codent pour la forme 1a alors que l'exon 1 et une partie de l'intron codent pour la forme 1b (13;14). De façon générale, la transcription de l'intron n'est que très rarement observée. La position des amorces sens et anti-sens sur le gène est donc primordiale et ces dernières doivent être situées sur les exons 1 et 2 du *GHS-R*, respectivement,

pour ne détecter que le sous-type 1a. Le choix inapproprié des amorces de la forme 1a du *GHS-R* a causé la controverse dans les études de distribution de l'expression du *GHS-R1a* au niveau des tissus périphériques. Les résultats étaient faussés par la détection de l'expression des deux sous-types du *GHS-R*. Gnanapavan et collaborateurs ont discuté en effet de cette controverse (19). Ils ont mentionné de plus que les résultats controversés de l'expression du *GHS-R1a* étaient également causés par l'utilisation de techniques variées, lesquelles diffèrent dans leur spécificité et leur sensibilité.

Afin de nous assurer que l'optimisation des paramètres de RT-PCR pour la détection de l'expression du *GHS-R1a* était exacte, nous avons reproduit une expérience réalisée par Wu et collaborateurs (26), la seule étude montrant une expression du *GHS-R1a* dans les CMLV. L'expérience *in vitro* consistait à stimuler les cellules aux LPS à différentes concentrations pendant 4 h. Nos résultats montrent le même profil d'expression que celui obtenu par l'équipe de Wu (figure 17B), c'est-à-dire qu'une augmentation de l'expression du *GHS-R1a* est observée en réponse aux LPS. Ces résultats confirment que les paramètres de RT-PCR ont été optimisés adéquatement, le but premier de cette expérience.

L'expression majeure du *GHS-R1a* se situe au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus (9;17;19;21). De nombreux autres tissus expriment le récepteur à plus faible niveau, dont ceux du système cardiovasculaire (19;25). Dans notre étude, nous avons comparé l'expression du *GHS-R1a* dans les CMLV avec l'expression d'autres types cellulaires, dont les cellules GH3 et les cellules J774 (figure 18A). Les cellules GH3 (contrôle positif) et J774 sont respectivement des cellules hypophysaires tumorales de rat et des monocytes de souris. Les monocytes/macrophages sont des cellules également impliquées au cours du développement de l'athérosclérose. Nous avons montré que le *GHS-R1a* est plus exprimé dans les CMLV que les GH3, ce qui

nous a surpris. Nous nous attendions à obtenir une expression du *GHS-R1a* dans les cellules GH3 supérieure à celle des CMLV, puisque dans la littérature aucun tissu périphérique ne démontre une expression plus élevée qu'à celle de l'hypophyse ou l'hypothalamus (19). L'utilisation de cellules hypophysaires immortelles en culture (GH3), dont le phénotype est modifié, peut expliquer cette différence d'expression comparativement au tissu hypophysaire. En effet, l'expression du *GHS-R1a* est beaucoup plus faible dans les cellules GH3 comparativement à celle dans l'hypothalamus (48). Il aurait fallu vérifier l'expression du *GHS-R1a* dans le tissu hypophysaire de rat. Les cellules de monocytes en culture (J774) ne semblent pas exprimer le *GHS-R1a*. Jusqu'à présent, aucun groupe de recherche n'a publié une expression du *GHS-R1a* dans les monocytes/macrophages.

Nous avons par la suite vérifié si l'ARNm du *GHS-R1a* était traduit en protéine dans les CMLV par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps spécifique au *GHS-R1a* (figure 18B). La présence du récepteur au niveau des membranes des CMLV à 46 kDa suggère un rôle possible du *GHS-R1a* au niveau de ce type cellulaire. Wu et collaborateurs ont aussi détecté la protéine du *GHS-R1a* dans les cellules musculaires lisses (26). Ils ont montré que les LPS régulent de façon positive les niveaux du récepteur dans ce type cellulaire. Il aurait été intéressant de répéter également cette expérience. Nous avons montré qu'à 46 kDa, le *GHS-R1a* est présent dans les CMLV, absent du contrôle négatif (cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes) et présent à de très faibles niveaux dans les cellules GH3. Le poids moléculaire du *GHS-R1a* de 46 kDa est compatible à celui retrouvé sur la fiche explicative de l'anticorps anti-*GHS-R1a* d'Alpha Diagnostic International. Le niveau très faible du *GHS-R1a* dans les cellules GH3 est surprenant. Un niveau comparable à celui des CMLV aurait été attendu, étant donné que l'expression du gène par RT-PCR dans les GH3 et les CMLV est semblable. Ce résultat suggère que l'ARNm du *GHS-R1a* est modifié (post-transcriptionnelle) ou utilisé différemment entre les

deux types cellulaires, résultant d'une production différente de protéine. Un autre contrôle positif aurait dû être utilisé, par exemple le tissu hypophysaire de rat. À 42 et 44 kDa, des bandes de forte intensité sont observées dans les cellules 3T3-L1, mais également à 60, 75 et 85 kDa. En effet, l'expression du GHS-R1a est controversée dans les adipocytes. Deux équipes ont travaillé avec les cellules 3T3-L1 et ils ont observé une expression inverse du GHS-R1a (41;343). Zhang et collaborateurs n'ont observé aucune expression du *GHS-R1a* par RT-PCR dans les 3T3-L1 (343) tandis que Kim et collaborateurs ont montré une expression du *GHS-R1a* par RT-PCR et la présence du récepteur par immunobuvardage (42 kDa) (41). L'utilisation des cellules 3T3-L1 est peut-être un mauvais choix de contrôle négatif. Les bandes intenses à 60, 75 et 85 kDa au niveau de ce type cellulaire peuvent correspondre à des bandes non spécifiques. D'éventuelles expériences pourraient être réalisées pour mieux comprendre la présence de ces bandes. La variabilité du poids moléculaire du GHS-R1a peut s'expliquer par différentes modifications post-traductionnelles, telles que la glycosylation qui peut varier d'un type cellulaire à l'autre (9).

4.2 Implication des voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2 dans les CMLV en réponse à la ghreline et à la des-acyl ghreline

Les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2 (MAPK) participent à plusieurs réponses cellulaires, dont la prolifération, la migration et la survie des cellules (77;80). En réponse à différents stimuli, ces voies stimulent la prolifération des CMLV. Par exemple, l'ang II active les voies des MAPK ERK1/2, JNK et p38, menant à la prolifération des CMLV (242;344). Le facteur de croissance PDGF active aussi plusieurs voies impliquées dans la prolifération des CMLV, dont la voie des MAPK qui est connue pour jouer un rôle important dans la réponse mitogénique d'un facteur de croissance (259;344). Les voies de PI3 kinase et de PLC sont également activées par le PDGF dans les CMLV (259). Il a été

rapporté que la ghrelina active les voies de PI3 kinase/Akt et/ou ERK1/2 en situation de prolifération ou de survie dans différents types cellulaires, tels que les cellules d'adénocarcinomes pancréatiques (49), de la ZG du cortex surrénalien (199;202), hypophysaires (GH3) (48), 3T3-L1 (41), d'hépatomes (52) et les cardiomyocytes (H9c2) (203). Dans notre étude, nous avons montré que la ghrelina stimule également ces voies au niveau des CMLV (figures 19 et 20). En parallèle à la ghrelina, nous avons étudié l'effet de la des-acyl ghrelina. La des-acyl ghrelina est la forme non octanoylée de la ghrelina. Le groupement n-octanoylé de la ghrelina lui confère son activité biologique à travers le GHS-R1a (83). Contrairement à la ghrelina, la des-acyl ghrelina n'a pas d'affinité pour le GHS-R1a (84-86) et ne stimule pas la relâche de l'hormone de croissance (83). Par contre, la des-acyl ghrelina est retrouvée en plus grande quantité dans la circulation sanguine (87). Au début de sa découverte, aucune activité biologique ne lui avait été assignée. Cependant, depuis quelques années, de plus en plus d'études suggèrent que la des-acyl ghrelina partage des actions biologiques avec la ghrelina, notamment elles stimulent la prolifération des cellules GH3 (48) et inhibent la mort cellulaire des cardiomyocytes (H9c2) et des cellules endothéliales (203). Nous avons montré dans notre étude que la des-acyl ghrelina stimule également les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2 dans les CMLV avec un profil similaire à celui de la ghrelina. Elles partagent donc les mêmes voies de signalisation dans les CMLV.

La ghrelina et la des-acyl ghrelina stimulent la phosphorylation de ERK1/2 dans les CMLV après 10 min de stimulation des cellules, comparable aux actions du PDGF et de l'ang II (figure 19A). Dans la plupart des études sur l'activation de voies de signalisation impliquant des kinases, la phosphorylation de la kinase est analysée par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps phosphospécifique. Malgré que la phosphorylation d'une protéine ne reflète pas complètement l'activité phosphotransférase de cette dernière, cette

approche est tout de même acceptée lors de la publication d'articles scientifiques. Par exemple, Baldanzi et collaborateurs, qui ont montré que la ghreline et la des-acyl ghreline activent les voies de ERK1/2 et de PI3 kinase/Akt dans les cardiomyocytes, ont utilisé l'immunobuvardage pour détecter l'activation de ces voies en réponse aux peptides (203). Nous avons tenté des expériences d'essai kinase *in vitro* pour analyser l'activité phosphotransférase de ERK1/2 suite à une stimulation des CMLV à la ghreline ou à la des-acyl ghreline. Cependant, l'ang II utilisée comme contrôle positif ne stimule que de 2,3 fois l'activité de ERK1/2 (figure 19B). Pourtant, dans une expérience similaire, il a été montré que l'ang II stimule d'au moins 5 fois l'activité de ERK1/2 dans les CMLV après 5 min de stimulation (247;345). Puisque l'effet de l'ang II est inférieur à ce qui est observé dans la littérature, nous pensons que l'expérience d'essai kinase *in vitro* réalisée n'est pas représentative de ce qui se passe réellement au niveau des CMLV. De plus, dans cette expérience, la des-acyl ghreline ne semble avoir aucun effet sur l'activité de ERK1/2 alors qu'en immunobuvardage, elle joue le même rôle que la ghreline. Il est ainsi préférable de ne considérer que les expériences d'immunobuvardage dont les résultats sont reproductibles et non ambigus.

La ghreline et la des-acyl ghreline stimulent également la phosphorylation de Akt dans les CMLV, laquelle est inhibée complètement par un inhibiteur de PI3 kinase, LY294002 (figure 20). LY294002 est un inhibiteur compétitif pour le site de liaison de l'ATP sur PI3 kinase. Il abolit alors complètement et spécifiquement l'activité de PI3 kinase (346). Dans la littérature, deux inhibiteurs de PI3 kinase sont habituellement utilisés pour inhiber l'action de Akt : Wortmannin et LY294002. Dans la plupart des cas, l'activation de Akt est dépendante de celle de PI3 kinase, qui est situé en amont de Akt (347). L'utilisation d'un inhibiteur de PI3 kinase montre en effet cette relation. Nos résultats ont montré que la phosphorylation de Akt par la ghreline et la des-acyl ghreline n'est pas aussi stimulée qu'en réponse au PDGF, le

contrôle positif. Ce peptide stimule très fortement la voie de Akt dans les CMLV (exemple : (348)). Dans les CMLV, la ghreline et la des-acyl ghreline ne semblent pas agir de la même façon que le PDGF. En effet, le niveau de phosphorylation de ERK1/2 induit par la ghreline est semblable à celui obtenu en réponse au PDGF, alors que le niveau de phosphorylation de Akt est beaucoup moins important suite à une stimulation à la ghreline qu'au PDGF. Les réponses cellulaires induites par le PDGF dans les CMLV sont probablement différentes de celles médiées par les deux formes de ghreline.

Sachant que les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2 sont activées dans les CMLV en réponse à la ghreline ou à la des-acyl ghreline, il était intéressant d'étudier plus en détail la signalisation intracellulaire induite par les deux formes de ghreline. Nous avons montré dans les CMLV que les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2, activées par la ghreline ou la des-acyl ghreline, sont interreliées (figure 21). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de PI3 kinase, LY294002, et de Akt, SH-5, a permis de mieux caractériser la voie de transduction du signal. Le SH-5, un analogue phosphatidylinositol, prévient la formation de PIP₃ et sa liaison à Akt, bloquant ainsi spécifiquement la phosphorylation de Akt et son activité (342;349). Nous avons montré que la phosphorylation de ERK1/2 induite par la ghreline ou la des-acyl ghreline est inhibée par un prétraitement des cellules au LY294002 ainsi qu'au SH-5. Ces résultats suggèrent que la kinase Akt, laquelle est stimulée par PI3 kinase, active ERK1/2 suite à des stimulations des cellules à la ghreline ou à la des-acyl ghreline. La phosphorylation de ERK1/2 par Akt est probablement indirecte. En fait, une phosphorylation directe de ERK1/2 par Akt, une sérine/thréonine kinase, est peu envisageable puisque ERK1/2 est actif par la phosphorylation d'une tyrosine (204/187) et d'une thréonine (202/185). L'activation de la voie de ERK1/2 par PI3 kinase/Akt semble prédominante en réponse aux deux formes de ghreline. Lors de la prolifération des adipocytes (41) et durant la survie des cardiomyocytes et des cellules endothéliales (203),

la ghreline active les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2, mais les équipes de recherche n'ont pas étudié l'interrelation possible entre les deux voies. En effet, aucune étude impliquant la ghreline ne montre une interrelation entre ces deux voies de signalisation. Néanmoins, une interrelation a déjà été observée au niveau des CMLV suite à une stimulation aux LDL oxydés (267). Un prétraitement des cellules à la Wortmannin ou au LY294002 inhibe la phosphorylation de la MAPK ERK1/2 et de l'incorporation de ³H-thymidine induites par les LDL oxydés. Leurs résultats suggèrent que l'effet mitogénique des LDL oxydés sur les CMLV est induit par l'activation de PI3 kinase/Akt/MEK/ERK1/2. Dans cette étude, Akt stimule la voie de ERK1/2 via l'activateur direct de ERK1/2, soit MEK qui est une MAPK kinase. Nos présents résultats ne permettent pas de confirmer à quel niveau de la voie MAPK, l'action de Akt a lieu, mais ses possibilités d'action sont discutées à la section 4.5.

L'agent mitogénique PDGF a été utilisé dans notre étude comme contrôle positif. Une augmentation de la phosphorylation de Akt et de ERK1/2 est observée suite à une stimulation des CMLV au PDGF (figure 21B) (259). Le LY294002, inhibiteur de PI3 kinase, inhibe la phosphorylation de Akt induite par le PDGF (350) tandis que le SH-5, inhibiteur de Akt, n'a aucun effet sur sa cible, ce qui est surprenant. Le SH-5 devrait être en mesure d'empêcher la liaison de PIP₃ à Akt et ainsi inhiber sa phosphorylation. Il a été montré que l'inhibition de l'activité de Akt par SH-5 était similaire à l'action inhibitrice de LY294002 (349). Nous ne pouvons mettre en doute l'efficacité de SH-5, puisqu'une inhibition est observée en réponse à la ghreline. Dans ce cas-ci, il est possible que le prétraitement de 30 min à l'inhibiteur ne soit pas suffisamment long pour permettre une inhibition complète de la phosphorylation de Akt par SH-5. En plus, la forte action du PDGF sur Akt pourrait réduire l'efficacité de l'inhibiteur. Malheureusement, très peu d'études ont utilisé cet inhibiteur. Ensuite, aucune inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 n'est

observée avec un prétraitement des cellules au LY294002, suggérant que les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2 ne sont pas interreliées suite à la stimulation des CMLV au PDGF. Une telle expérience ne semble pas avoir déjà été montrée dans les CMLV. Cependant, le PDGF active indépendamment les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2 dans les cellules pancréatiques de rat. Dans ce type cellulaire, un inhibiteur de PI3 kinase inhibe la phosphorylation de Akt mais non celle de ERK1/2 (351). Nos résultats observés en réponse au PDGF suggèrent que la ghreline et la des-acyl ghreline stimulent les voies de signalisation dans les CMLV différemment du PDGF. De plus, il est à noter qu'une stimulation des CMLV au PDGF semble induire une dégradation de la protéine Akt totale. Cependant, cette dégradation n'a pas lieu en présence d'un inhibiteur de PI3 kinase. Nous observons que Akt doit être phosphorylé par le PDGF pour que sa protéine totale soit dégradée. En effet, il a été rapporté qu'une stimulation des CMLV au PDGF active la phosphorylation de Akt avec une rapide diminution de la protéine Akt totale (352). Cette régulation négative de Akt, qui a lieu via un mécanisme dépendant de PI3 kinase, est abolit par un inhibiteur du protéasome, le MG-132. Cette étude suggère que la protéine Akt serait dégradée par le protéasome suite à sa liaison à une molécule inconnue ubiquitinée en réponse au PDGF dans les CMLV (352).

4.3 Implication du ou des récepteurs, dont le GHS-R1a, dans l'action de la ghreline et de la des-acyl ghreline au niveau des CMLV

Nous avons observé dans notre étude que le *GHS-R1a* est exprimé dans les CMLV et que le récepteur est détectable à la membrane (figure 3.2). Le groupement n-octanoylé de la ghreline est essentiel à l'activation du GHS-R1a, lui permettant ainsi la transduction du signal dans la cellule (83). La forme non octanoylée de la ghreline, la des-acyl ghreline, n'a aucune affinité pour le

récepteur (84-86). Nous avons montré que la ghreline et la des-acyl ghreline partagent les mêmes voies de signalisation. Dans les CMLV, la stimulation de la voie de PI3 kinase/Akt/ERK1/2 par les deux formes de ghreline passerait-elle par l'activation d'un même récepteur ou par deux récepteurs différents, dont l'un serait le GHS-R1a? Dans les cellules GH3, qui expriment le *GHS-R1a*, la ghreline et la des-acyl ghreline stimulent la prolifération cellulaire via l'activation de plusieurs voies de signalisation, dont PKC, ERK1/2 et tyrosine kinase (48). Dans cette étude, Nanzer et collaborateurs suggèrent que l'action de la ghreline sur les cellules GH3 a lieu via le GHS-R1a, malgré qu'aucune expérience de leur étude ne le prouve réellement. Malheureusement, l'équipe de recherche ne propose aucun mécanisme d'action de la des-acyl ghreline. Trois études ont montré l'implication du GHS-R1a dans l'action de la ghreline par l'utilisation d'un antagoniste du GHS-R1a, le D-Lys-GHRP-6, lequel inhibe l'action de la ghreline (30;31;49). Cependant, ces équipes n'ont pas analysé l'effet de la des-acyl ghreline. Parmi les autres études qui ont étudié l'action de la des-acyl ghreline en parallèle à celle de la ghreline, le *GHS-R1a* n'est pas exprimé dans les types cellulaires étudiés (50;203;204). Par exemple, dans les cellules de carcinomes mammaires humains et de prostate humaine, lesquelles n'expriment pas le GHS-R1a, la ghreline et la des-acyl ghreline ont des effets anti-prolifératifs via l'activation d'un récepteur commun, différent du GHS-R1a (50;204). En effet, des sites de liaison spécifiques, communs aux deux formes de ghreline et aux GHS synthétiques (Hexaréline et MK-0677), ont été observés (50). Cassoni et collaborateurs ont montré que la des-acyl ghreline déplace la ghreline sur le site de liaison (204). Ces études suggèrent la présence d'un récepteur distinct du GHS-R1a, commun à la ghreline et à la des-acyl et dont l'acylation du peptide n'est pas critique pour l'activation du récepteur encore inconnu. De plus, Baldanzi et collaborateurs ont rapporté que les deux formes de ghreline stimulent les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2 dans les cardiomyocytes (H9c2), lesquelles n'expriment pas le GHS-R1a (203). L'équipe propose donc l'implication d'un récepteur distinct du GHS-R1a.

Dans notre étude, nous ne pouvons confirmer l'implication unique du GHS-R1a en réponse à la ghreline dans les CMLV. Nous avons montré que le récepteur est présent à la membrane des CMLV, mais aucune expérience ne prouve qu'il soit fonctionnel ou impliqué en réponse à la ghreline. Puisque la des-acyl ghreline n'a pas d'affinité de liaison pour le GHS-R1a et que nos résultats montrent une réponse de ce peptide dans notre modèle cellulaire, il semble évident qu'il existe un autre récepteur distinct du GHS-R1a qui permet la transduction du signal de la des-acyl ghreline dans les CMLV. Ce récepteur ne peut être le GHS-R1b, puisqu'il est tronqué et il semble non fonctionnel dans la cellule. Selon les études de la littérature, il existe un récepteur, encore inconnu, qui possède des sites de liaison communs autant pour la des-acyl ghreline que pour la ghreline. Cependant, aucune étude n'a encore découvert un récepteur spécifique à la des-acyl ghreline. Il a été suggéré que ce nouveau récepteur serait probablement similaire au GHS-R1a, parce que deux autres ligands du GHS-R1a, l'hexaréline et le MK-0677, lient et activent ce dernier (203). Il serait donc plausible de penser qu'il existe dans les CMLV un récepteur qui lie autant la des-acyl ghreline que la ghreline. Beaucoup d'autres études restent à venir pour répondre à la question de l'implication du GHS-R1a et pour identifier le récepteur distinct du GHS-R1a. L'utilisation d'antagonistes du GHS-R1a, par exemple le D-Lys-GHRP-6, permettrait d'étudier l'implication du récepteur dans les CMLV en réponse à la ghreline. L'identification du récepteur de la des-acyl ghreline est également un projet important. Suite à la liaison covalente du récepteur avec la des-acyl ghreline iodée et liée à un groupement Bpa (benzoïde phénylalanine), plusieurs étapes de purification du complexe pourraient être réalisées pour isoler le récepteur, lequel pourrait ensuite être séquencé.

4.4 Effet de la ghrelina et de la des-acyl ghrelina sur la prolifération cellulaire

Nos résultats ont montré que la ghrelina et la des-acyl ghrelina ne stimulent pas la prolifération des CMLV. Les deux formes de ghrelina ne sont ni des agents hyperplasiques ni hypertrophiques au niveau des CMLV (figure 22). Au cours du développement de l'athérosclérose, plusieurs étapes critiques mènent à la formation des lésions dans la paroi vasculaire. La migration et la prolifération anormales des CMLV font partie de ces étapes critiques. Quelques études suggéraient que la ghrelina pouvait participer à la prolifération des CMLV durant le développement de l'athérosclérose. En effet, il a été montré que la ghrelina stimule la prolifération de différents types cellulaires, tels que les cellules hypophysaires (GH3) (48), du cortex surrénalien (ZG) (199;202) et pancréatiques (49), les cardiomyocytes (H9c2) (200), les adipocytes (3T3-L1) (41), les ostéoblastes (29-31) et plusieurs cellules tumorales (35;49;52;201). Cependant, dans certains cas, la ghrelina serait plutôt un agent anti-prolifératif, entre autres, sur les cellules de carcinomes mammaires (50;201), thyroïdiens (98) et de prostate (204). Il semble que la sensibilité des cellules à répondre à la ghrelina varie selon le type cellulaire. Après avoir confirmé que les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2, deux voies impliquées dans la prolifération cellulaire, étaient activées par la ghrelina dans les CMLV, il était intéressant d'étudier la réponse des cellules à la ghrelina. Nous avons donc montré que la ghrelina et la des-acyl ghrelina ne stimulent pas la synthèse d'ADN des CMLV, comparable à l'action de l'ang II (contrôle négatif). Il aurait été important de réaliser cette même expérience en utilisant les cellules GH3 comme contrôle positif. Il est connu que l'ang II n'active pas la synthèse d'ADN des CMLV (238). Cependant, ce peptide a la capacité de stimuler la synthèse protéique dans ce type cellulaire (237-239). L'action de la ghrelina est-elle semblable à celle de l'ang II dans notre modèle cellulaire? Nos

résultats ont montré que contrairement à l'ang II, la ghreline ne stimule pas la synthèse protéique des CMLV.

L'athérosclérose est une maladie complexe qui implique plusieurs mécanismes et molécules. Au cours du développement des plaques athérosclérotiques, plusieurs molécules sont sécrétées dans la paroi vasculaire en réponse au phénomène d'inflammation qui a lieu durant la pathologie. Entre autres, la sécrétion du PDGF est augmentée dans plusieurs types cellulaires du système cardiovasculaire (260). Il est connu que ce peptide stimule la prolifération des CMLV (259). Pour mimer la pathologie de l'athérosclérose *in vitro*, les CMLV ont été prétraitées au PDGF (5 ng/mL) et stimulées par la suite à la ghreline. Notre but était de vérifier s'il n'existait pas un effet synergique entre le PDGF et la ghreline pour stimuler la prolifération des CMLV. Nos résultats ont montré que la ghreline n'a aucun effet sur la prolifération des CMLV en absence ou en présence du PDGF (5 ng/mL). De plus, la ghreline ne semble pas influencer de façon significative l'effet hyperplasique de l'AngII dans les CMLV (résultats non montrés). Cependant, une autre molécule impliquée dans la pathologie de l'athérosclérose pourrait avoir cet effet synergique avec la ghreline pour stimuler la prolifération des CMLV. Pour le moment, aucune molécule en particulier ne pourrait être nommée.

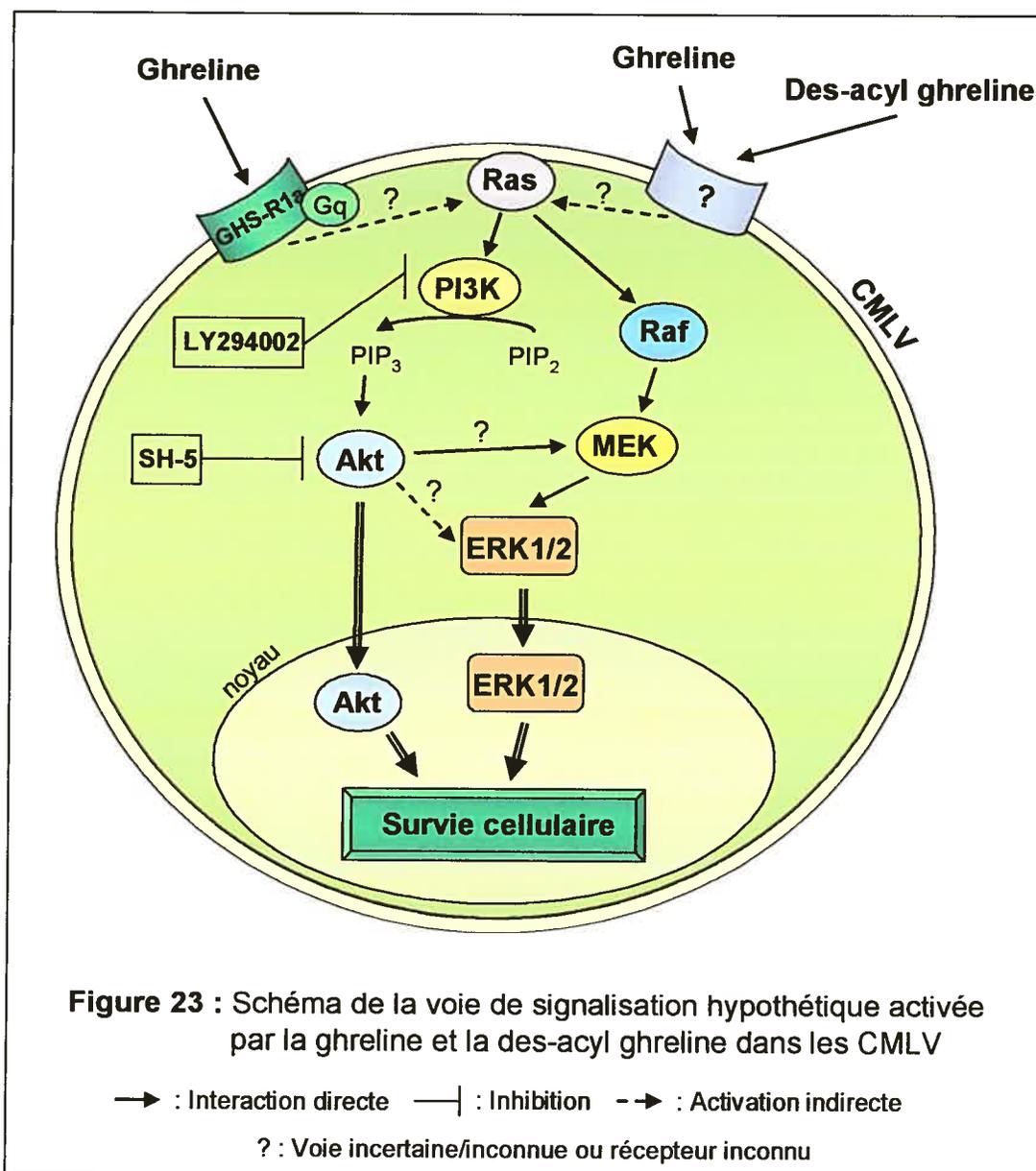
Les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2 sont impliquées dans plusieurs réponses cellulaires, dont la prolifération et la survie cellulaire. Puisque la ghreline et la des-acyl ghreline ne stimulent pas la prolifération des CMLV, il est possible que les deux formes de ghreline activent plutôt la survie des cellules. En effet, il a été montré que la ghreline et la des-acyl ghreline inhibent la mort cellulaire des cardiomyocytes (H9c2) via l'activation des voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2, favorisant ainsi la survie cellulaire (203). Indépendamment de son acylation, la ghreline semble être un facteur de survie au niveau du système cardiovasculaire via la liaison d'un récepteur distinct du

GHS-R1a, puisque ce dernier n'est pas exprimé dans les cellules H9c2. Suite aux résultats obtenus et à la littérature, nous pensons qu'en réponse à la ghreline ou à la des-acyl ghreline, la survie cellulaire pourrait être observée au niveau des CMLV. Plusieurs expériences devraient être réalisées pour répondre à cette nouvelle hypothèse. En effet, trois approches *in vitro* seraient utilisées pour induire l'apoptose des CMLV : l'irradiation aux ultraviolets (UV) à 254 nm, une exposition des cellules à 100 μ M de H₂O₂ pendant 12 h et l'utilisation d'agents chimiques comme la doxorubicine (2 μ g/mL) (348). Les cellules seraient ensuite stimulées à la ghreline ou à la des-acyl ghreline pour vérifier si ces peptides peuvent inhiber l'apoptose. Un prétraitement des cellules à la ghreline ou à la des-acyl ghreline suivi d'un traitement aux agents pro-apoptotiques permettrait d'observer si la ghreline peut prévenir la mort cellulaire. La viabilité des cellules serait vérifiée par différentes méthodes, telles qu'un essai MTT, la méthode TUNEL, l'utilisation d'une trousse de détection de la cytotoxicité (ELISA) et l'analyse de la fragmentation de l'ADN nucléosomal. L'activation des caspases 3 et 9 et l'expression des protéines Bcl-2 et Bax pourraient également être analysées à l'aide d'une trousse commerciale et par RT-PCR, respectivement. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la voie de PI3 kinase/Akt nous permettrait de confirmer si l'effet observé passerait par cette voie.

4.5 Voie de signalisation proposée dans les CMLV en réponse à la ghreline et à la des-acyl ghreline

Suite aux résultats obtenus dans cette étude, nous avons proposé une voie de signalisation hypothétique activée par la ghreline et la des-acyl ghreline au niveau des CMLV (figure 23). Tout d'abord, la ghreline active le GHS-R1a et/ou le récepteur inconnu à la surface des CMLV. Quant à la des-acyl ghreline, elle ne peut qu'activer le récepteur distinct du GHS-R1a, puisqu'elle n'a pas d'affinité pour le GHS-R1a. Nos résultats ont montré que l'activation du

ou des récepteur(s) permet la stimulation de PI3 kinase, lequel active la protéine Akt, puisqu'une inhibition de Akt est observée en présence d'un inhibiteur de PI3 kinase (LY294002). Une fois activée, la kinase Akt stimule la voie de ERK1/2. Des inhibiteurs de PI3 kinase (LY294002) et de Akt (SH-5) confirment que la phosphorylation de ERK1/2 passe par PI3 kinase/Akt et non pas par PI3 kinase seul. En effet, dans certaines conditions, PI3 kinase peut



activer la voie de MAPK en agissant sur Ras directement (340). Nos expériences ne montrent cependant pas comment la protéine Akt active ERK1/2. Il est connu que Akt peut phosphoryler Raf sur sa sérine 259 dans les cellules HEK293 (353) et dans les CMLV (354). Par contre, la phosphorylation de Raf par Akt inhibe l'activation de la voie Raf/MEK/ERK. Dans notre modèle, la phosphorylation de Raf par Akt est peu probable, puisque la voie de ERK1/2 est activée au lieu d'être inhibée suite à une stimulation de Akt. La protéine Akt pourrait phosphoryler MEK en réponse à la ghreline ou à la des-acyl ghreline. L'activation de MEK par Akt a déjà été montrée dans les CMLV à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques suite à une stimulation des cellules aux LDL oxydés, résultant d'une prolifération cellulaire (267). La stimulation directe de ERK1/2 par Akt est peu probable, puisque Akt est une sérine/thréonine kinase.

Dans notre étude, nous n'avons pas montré comment le ou les récepteurs activent PI3 kinase. Plusieurs types de récepteur peuvent activer PI3 kinase, dont les récepteurs tyrosine kinases et les récepteurs couplés aux protéines G. Le GHS-R1a est un récepteur à 7 passages transmembranaires couplé à la protéine $G_{\alpha q}$ (9). Il a été proposé que le récepteur de la des-acyl ghreline serait très similaire au GHS-R1a, suggérant qu'il serait probablement un récepteur couplé aux protéines G (203). Il a été rapporté qu'un lien existe entre les récepteurs couplés aux protéines G et la voie de MAPK via PI3 kinase γ (355). Dans cette étude, la stimulation de la voie MAPK par PI3 kinase nécessite l'activation d'une tyrosine kinase, Shc, Grb2, Sos, Ras et Raf. Puisque la voie prédominante stimulée par la ghreline et la des-acyl ghreline dans les CMLV passe par Akt, cette possibilité serait à rejeter. En plus d'activer la voie des MAPK, Ras, situé en amont, peut également interagir directement avec PI3 kinase (76;356). Dans notre modèle, l'activation de PI3 kinase par Ras serait possible, mais des expériences devront être faites pour confirmer cette voie dans les CMLV en réponse à la ghreline ou à la des-acyl ghreline.

Plusieurs études restent encore à venir pour élucider la voie de signalisation complète de la ghreline et de la des-acyl ghreline dans les CMLV. Néanmoins, il semble évident que la voie de PI3 kinase/Akt/ERK1/2 est la voie prédominante stimulée par les deux formes de ghreline au niveau des CMLV. Suite à une stimulation des CMLV à la ghreline ou à la des-acyl ghreline, les phosphorylations de Raf et de MEK1/2 devraient tout d'abord être vérifiées par immunobuvardage. Par la suite, des plasmides encodant pour des mutants dominants négatifs de Akt (Akt-DN) ou de la sous-unité p85 de PI3 kinase (p85-DN) pourraient être utilisés pour étudier la cible de Akt sur la voie de ERK1/2. Les CMLV seraient transfectées avec un plasmide codant pour Akt-DN ou p85-DN. Suite à une stimulation des cellules à la ghreline ou à la des-acyl ghreline, les phosphorylations de Raf, MEK1/2 et ERK1/2 seraient analysées par immunobuvardage. De plus, malgré que la survie cellulaire semble probable, la réponse cellulaire exacte de la ghreline dans les CMLV devra également être déterminée.

4.6 Rôle de la ghreline dans l'athérosclérose?

De plus en plus d'évidences suggèrent que la ghreline jouerait un rôle dans la pathologie de l'athérosclérose. Katugampola et collaborateurs ont été les premiers à proposer un rôle de la ghreline dans le développement de l'athérosclérose en démontrant que la densité du récepteur de la ghreline est augmentée dans des artères coronariennes athérosclérotiques comparativement à des artères saines (42). Par la suite, plusieurs autres actions de la ghreline reliées à la pathologie de l'athérosclérose ont été montrées. La ghreline est un agent vasodilatateur (25;317;318), améliore la dysfonction endothéliale et augmente l'expression de eNOS dans l'aorte (333), inhibe l'apoptose des cellules endothéliales (203) et a des effets anti-inflammatoires (28;338). Ces différents rôles de la ghreline au niveau du système cardiovasculaire pourraient suggérer un rôle plutôt anti-

athérosclérotique de la ghreline, mais aucune étude n'a montré clairement que la ghreline réduit ou augmente les plaques athérosclérotiques dans un modèle *in vivo*.

Au cours de la formation des plaques athérosclérotiques, les CMLV migrent et prolifèrent de façon anormale de la média vers l'intima dans la paroi vasculaire. Notre hypothèse de départ était que la ghreline stimule la prolifération des CMLV *in vitro* en activant différentes voies de signalisation. Nos résultats ont montré que la ghreline n'est pas un agent qui stimule la prolifération cellulaire. Néanmoins, elle active deux voies de signalisation importantes : PI3 kinase/Akt et ERK1/2. Étant donné que ces voies participent à plusieurs réponses cellulaires, dont la survie, l'activation de ces voies pourrait mener à l'inhibition de la mort cellulaire programmée des CMLV en réponse à la ghreline. En effet, il a déjà été montré que la ghreline peut inhiber la mort cellulaire des cardiomyocytes et des cellules endothéliales (203). À un stade avancé de l'athérosclérose, un corps nécrotique se forme dans la région de l'intima causé par la mort cellulaire des macrophages et des CMLV. De récentes études ont montré qu'en plus de la migration et de la prolifération des CMLV, l'apoptose de ce type cellulaire joue également un rôle dans la progression des plaques. Il a été démontré dans un modèle animal qu'une induction directe de l'apoptose des CMLV au niveau de la chape fibreuse provoque une rupture de la plaque (357). En effet, l'apoptose des CMLV influence la stabilité de la plaque en augmentant la possibilité d'une rupture et d'une thrombose. Une nouvelle hypothèse est proposée: la ghreline jouerait un rôle important au niveau de la stabilité de la plaque athéromateuse en inhibant l'apoptose des CMLV via les voies de PI3 kinase/Akt et ERK1/2. Si cette hypothèse était exacte, la ghreline serait plutôt un agent anti-athérosclérotique. Cette nouvelle hypothèse pourrait être étudiée par des expériences *in vitro* comme mentionnées précédemment à la section 4.4.

5.0 Conclusions et perspectives

Dans un premier temps, nous avons démontré que le récepteur de la ghreline, GHS-R1a, est exprimé dans les CMLV. Nous avons par la suite montré que la ghreline active la voie de ERK1/2 dans les CMLV en culture, puisqu'une phosphorylation de ERK1/2 est observée en réponse à la ghreline. L'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques LY294002 et SH-5 a permis de conclure que la voie de ERK1/2 stimulée par la ghreline est dépendante de la voie de PI3 kinase/Akt de façon prédominante. Malgré l'expression du GHS-R1a dans les CMLV, nous ne pouvons confirmer l'implication unique de ce récepteur en réponse à la ghreline. La des-acyl ghreline, la forme non octanoylée de la ghreline n'ayant aucune affinité de liaison pour le GHS-R1a, active également la voie de ERK1/2 dépendante de celle de PI3 kinase/Akt, suggérant que les deux formes de ghreline partagent les mêmes voies de signalisation. Ceci suggère l'existence potentielle d'un récepteur distinct du GHS-R1a exprimé dans les CMLV, dont l'activation par la des-acyl ghreline induit la phosphorylation de ERK1/2. Malgré l'activation de la voie PI3 kinase/Akt/ERK1/2, aucune prolifération cellulaire n'est observée suite à des stimulations des CMLV par la ghreline ou la des-acyl ghreline. La ghreline et la des-acyl ghreline ne semblent pas être des agents hyperplasiques ou hypertrophiques pour les CMLV.

L'identification des récepteurs impliqués dans l'activation de la voie PI3 kinase/Akt/ERK1/2 en réponse à la ghreline et à la des-acyl ghreline dans les CMLV et la caractérisation plus détaillée des voies de signalisation induites par la ghreline ou la des-acyl ghreline sont essentielles dans la suite de l'étude. La confirmation de l'implication du GHS-R1a dans les CMLV sera effectuée par l'utilisation des antagonistes spécifiques de la ghreline, dont le D-Lys-GHRP-6, suivie d'une étude de la modulation de la phosphorylation de ERK1/2 par la ghreline. L'identification du récepteur par lequel la des-acyl ghreline active les

voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2 dans les CMLV sera également importante afin de caractériser les sites de liaison de la des-acyl ghreline sur les CMLV. Cette caractérisation sera déterminée par des études de liaison à l'aide de la des-acyl ghreline radiomarquée, servant de radioligand, et des fragments de la des-acyl ghreline non radiomarqués. Des études de compétition et de saturabilité seront également réalisées. Le mécanisme par lequel le ou les récepteur(s) de la des-acyl ghreline et de la ghreline stimulent la voie de PI3 kinase/Akt et celui par lequel la protéine Akt active ERK1/2 dans les CMLV en réponse à la ghreline ou à la des-acyl ghreline seront utiles pour mieux définir les rôles de la ghreline et de la des-acyl ghreline au niveau des CMLV, mais également dans d'autres types cellulaires.

Nous avons montré que les CMLV ne prolifèrent pas en réponse à la ghreline ou à la des-acyl ghreline. Un effet anti-apoptotique potentiel de la ghreline sera analysé dans les CMLV, puisqu'il est connu que la ghreline et la des-acyl ghreline exercent un rôle anti-apoptotique dans les cardiomyocytes et les cellules endothéliales via les voies de PI3 kinase/Akt et de ERK1/2 (203). L'inhibition de l'apoptose des CMLV par la ghreline aurait un impact important sur la stabilité de la plaque athéromateuse, diminuant ainsi les risques de rupture de la plaque.

Des propriétés inflammatoires potentielles (pro- ou anti-) de la ghreline sur les CMLV seront également documentées. Des effets anti-inflammatoires de la ghreline seraient bénéfiques en situation d'athérosclérose, puisque l'inhibition de l'inflammation réduit la progression des lésions (280). Cette hypothèse du rôle de la ghreline dans l'inflammation pourrait être soulevée puisqu'il a été montré que la ghreline joue un rôle anti-inflammatoire sur les cellules endothéliales en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires et l'activation de la voie de NF- κ B induites par le TNF- α (338). Par ailleurs, la ghreline pourrait aussi avoir un effet pro-inflammatoire sur les CMLV, puisqu'il

est connu que la voie de ERK1/2 est impliquée de façon favorable dans le processus inflammatoire dans les macrophages (358). Les propriétés anti-inflammatoires de la ghreline sur les CMLV pourraient être déterminées en utilisant les cellules prétraitées au TNF- α pour induire l'inflammation et stimulées par la suite à la ghreline ou à la des-acyl ghreline. Les propriétés pro-inflammatoires de la ghreline seront documentées par l'analyse de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-8) et de l'activation de NF- κ B (translocation au noyau) par ELISA et par retardement sur gel, respectivement. La détermination du rôle de la ghreline et de la des-acyl ghreline au niveau des CMLV permettra de mieux cibler l'effet de la ghreline dans la modulation de la progression de l'athérosclérose et ainsi, de développer des agonistes ou des antagonistes de ce peptide afin de favoriser la réduction des plaques athérosclérotiques.

6.0 Références

1. Strobl JS, Thomas MJ. Human growth hormone. *Pharmacol Rev* 1994; 46:1-34.
2. Jorgensen JOL, Christiansen JS. Growth hormone therapy, brave new senescence: GH in adults. *Nature* 1993; 341:1247-1248.
3. Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Newlander K. Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone *in vitro*. *Endocrinology* 1981; 108:31-39.
4. Matsubara S, Sato M, Mizobuchi M, Niimi M, Takahara J. Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology* 1995; 136:4147-4150.
5. Camanni F, Ghigo E, Arvat E. Growth hormone-releasing peptides and their analogs. *Front Neuroendocrinol* 1998; 19:47-72.
6. Bowers CY, Alster DK, Frentz JM. The growth hormone-releasing activity of a synthetic hexapeptide in normal men and short statured children after oral administration. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:292-298.
7. Patchett AA, Nargund RP, Tata JR et al. Design and biological activities of L-163,191 (MK-0677): a potent, orally active growth hormone secretagogue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7001-7005.
8. Copinschi G, Van Onderbergen A, L'Hermite-Baleriaux M et al. Effects of a 7-day treatment with a novel, orally active, growth hormone (GH) secretagogue, MK-0677, on 24-hour GH profiles, insulin-like growth

- factor I, and adrenocortical function in normal young men. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:2776-2782.
9. Howard AD, Feighner SD, Cully DF et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; 273:974-977.
 10. Cheng K, Chan WWS, Butler B, Barrato A, Smith RG. Evidence for a role of protein kinase-C in His-D-Trp-Ala-D-Phe-Lys-amide induced growth hormone release from rat primary pituitary cells. *Endocrinology* 1991; 129:3337-3342.
 11. Bresson-Bepoldin L, Duffy-Barbe L. GHRP-6 induces a biphasic calcium response in rat pituitary somatotrophs. *Cell Calcium* 1994; 15:247-258.
 12. Mau SE, Witt MR, Bjerrum OJ, Saermark T, Vilhardt H. Growth hormone releasing hexapeptide (GHRP-6) activates the inositol (1, 4, 5)-triphosphate/diacylglycerol pathway in rat anterior pituitary cells. *J Recept Signal Transduction Res* 1995; 15:311-323.
 13. McKee KK, Palyha OC, Feighner SD et al. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol* 1997; 11:415-423.
 14. Petersenn S, Rasch AC, Penschorn M, Beil FU, Schulte HM. Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 2001; 142:2649-2659.
 15. Howard AD, Pong SS, McKee KK et al. Molecular analysis of the growth hormone secretagogue receptor. In: Ghigo E, Boghen M, Casanueva FF,

- Dieguez C, editors. Growth hormone secretagogues. Elsevier Science BV, 1999: 35-63.
16. McKee KK, Tan CP, Palyha OC et al. Cloning and characterization of two human G protein-coupled receptor genes (GPR38 and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors. *Genomics* 1997; 46:426-434.
 17. Guan XM, Yu H, Palyha OC et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Mol Brain Res* 1997; 48:23-29.
 18. Yokote R, Sato M, Matsubara S et al. Molecular cloning and gene expression of growth hormone-releasing peptide receptor in rat tissues. *Peptides* 1998; 19:15-20.
 19. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2988-2991.
 20. Smith RG, Van der Ploeg LHT, Howard AD et al. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 1997; 18:621-645.
 21. Bennett PA, Thomas GB, Howard AD et al. Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology* 1997; 138:4552-4557.
 22. Katayama M, Nogami H, Nishiyama J, Kawase K, Kawamura K. Developmentally and regionally regulated expression of growth hormone secretagogue receptor mRNA in rat brain and pituitary gland. *Neuroendocrinology* 2000; 72:333-340.

23. Cowley MA, Smith RG, Diano S et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003; 37:649-661.
24. Shuto Y, Shibasaki T, Wada K et al. Generation of polyclonal antiserum against the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R): evidence that the GHS-R exists in the hypothalamus, pituitary and stomach of rats. *Life Sci* 2001; 68:991-996.
25. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2001; 280:R1483-R1487.
26. Wu R, Zhou M, Cui X, Simms HH, Wang P. Upregulation of cardiovascular ghrelin receptor occurs in the hyperdynamic phase of sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287:H1296-H1302.
27. Iglesias MJ, Pineiro R, Blanco M et al. Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2004; 62:481-488.
28. Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS et al. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest* 2004; 114:57-66.
29. Maccarinelli G, Sibilina V, Torsello A et al. Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *J Endocrinol* 2005; 184:249-256.
30. Fukushima N, Hanada R, Teranishi H et al. Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res* 2005; 20:790-798.

31. Kim SW, Her SJ, Park SJ et al. Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone* 2005; 37:359-369.
32. Papotti M, Ghè C, Cassoni P et al. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3803-3807.
33. Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK et al. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:879-887.
34. Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Pappoti M. Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. *J Histochem Cytochem* 2002; 50:1013-1021.
35. Jeffery PL, Herington AC, Chopin LK. Expression and action of the growth hormone releasing peptide ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines. *J Endocrinol* 2002; 172:R7-R11.
36. Mori K, Yoshimoto A, Takaya K et al. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett* 2000; 486:213-216.
37. Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC et al. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 2002; 143:717-725.
38. Barreiro ML, Suominen JS, Gaytan F et al. Developmental, stage-specific, and hormonally regulated expression of growth hormone secretagogue receptor messenger RNA in rat testis. *Biol Reprod* 2003; 68:1631-1640.

39. Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE et al. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:400-409.
40. Choi K, Roh SG, Hong YH et al. The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology* 2003; 144:754-759.
41. Kim MS, Yoon CY, Jang PG et al. The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2004; 18:2291-2301.
42. Katugampola SD, Pallikaros Z, Davenport AP. [¹²⁵I-*His*⁹]-Ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue; up-regulation of receptors with atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 2001; 134:143-149.
43. Adams EF, Huang B, Buchfelder M et al. Presence of growth hormone secretagogue receptor messenger ribonucleic acid in human pituitary tumors and rat GH3 cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:638-642.
44. Korbonits M, Jacobs RA, Aylwin SJB et al. Expression of the growth hormone secretagogue receptor in pituitary adenomas and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3624-3630.
45. Barlier A, Zamora AJ, Grino M et al. Expression of functional growth hormone secretagogue receptors in human pituitary adenomas: polymerase chain reaction, triple in-situ hybridization and cell culture studies. *J Neuroendocrinol* 1999; 11:491-502.

46. Korbonits M, Bustin SA, Kojima M et al. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:881-887.
47. Korbonits M, Kojima M, Kangawa K, Grossman AB. Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* 2001; 14:101-104.
48. Nanzer AM, Khalaf S, Mozid AM et al. Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Endocrinol* 2004; 151:233-240.
49. Duxbury MS, Waseem T, Ito H et al. Ghrelin promotes pancreatic adenocarcinoma cellular proliferation and invasiveness. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309:464-468.
50. Cassoni P, Papotti M, Ghè C et al. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1738-1745.
51. Papotti M, Cassoni P, Volante M, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E. Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5052-5059.
52. Murata M, Okimura Y, Iida K et al. Ghrelin modulates the downstream of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277:5667-5674.

53. Kaji H, Tai S, Okimura Y, Iguchi G, Takahashi Y, Abe H. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human growth hormone secretagogue receptor gene. *J Biol Chem* 1998; 273:33885-33888.
54. Horikawa R, Tachibana T, Katsumata N, Ishikawa H, Tanaka T. Regulation of pituitary growth hormone-secretagogue and growth hormone-releasing hormone receptor RNA expression in young dwarf rats. *Endocr J* 2000; 47:S53-S56.
55. Kamegai J, Wakabayashi I, Miyamoto K, Unterman TG, Kineman RD, Frohman LA. Growth hormone-dependent regulation of pituitary GH secretagogue receptor (GHS-R) mRNA levels in the spontaneous dwarf rat. *Neuroendocrinology* 1998; 68:312-318.
56. Carmignac DF, Bennett PA, Robinson ICAF. Effects of growth hormone secretagogues on prolactin release in anesthetized dwarf (dw/dw) rats. *Endocrinology* 1998; 139:3590-3596.
57. Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Kineman RD, Frohman LA, Wakabayashi I. Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone secretagogue receptor gene expression. *J Neuroendocrinol* 2000; 12:481-485.
58. Thomas GB, Bennett PA, Carmignac DF, Robinson ICAF. Glucocorticoid regulation of growth hormone (GH) secretagogue-induced growth responses and GH secretagogue receptor expression in the rat. *Growth Horm IGF Res* 2000; 10:45-52.
59. Kaji H, Kishimoto M, Kirimura T et al. Hormonal regulation of the human ghrelin receptor gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:660-666.

60. Kamegai J, Tamura H, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Thyroid hormones regulate pituitary growth hormone secretagogue receptor gene expression. *J Neuroendocrinol* 2001; 13:275-278.
61. Kineman RD, Kamegai J, Frohman LA. Growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) and the GH secretagogue (GHS), L692,585, differentially modulate rat pituitary GHS receptor and GHRH receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 1999; 140:3581-3586.
62. Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB. Ghrelin-a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25:27-68.
63. Pong SS, Chaung LYP, Dean DC, Nargund RP, Patchett AA, Smith RG. Identification of a new G-protein-linked receptor for growth hormone secretagogues. *Mol Endocrinol* 1996; 10:57-61.
64. Lei T, Buchfelder M, Fahlbusch R, Adams EF. Growth hormone releasing peptide (GHRP-6) stimulates phosphatidylinositol (PI) turnover in human pituitary somatotroph cells. *J Mol Endocrinol* 1995; 14:135-138.
65. Adams EF, Petersen B, Lei T, Buchfelder M, Fahlbusch R. The growth hormone secretagogue, L-692 429, induces phosphatidylinositol hydrolysis and hormone secretion by human pituitary tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 208:555-561.
66. Herrington J, Hille B. Growth hormone-releasing hexapeptide elevates intracellular calcium in rat somatotrophes by 2 mechanisms. *Endocrinology* 1994; 135:1100-1108.

67. Malagon MM, Luque RM, Ruiz-Guerrero E et al. Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes. *Endocrinology* 2003; 144:5372-5380.
68. Chen C. Growth hormone secretagogue actions on the pituitary gland: multiple receptors for multiple ligands? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27:323-329.
69. Petersenn S. Structure and regulation of the growth hormone secretagogue receptor. *Minerva Endocrinologica* 2002; 27:243-256.
70. Cheng K, Chan WW, Barreto Jr A, Convey EM, Smith RG. The synergistic effects of His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ on growth hormone(GH)-releasing factor-stimulated GH release and intracellular adenosine 3'-5'-monophosphate accumulation in rat pituitary cell culture. *Endocrinology* 1989; 124:2791-2798.
71. Wu D, Chen C, Clarke IJ. The effect of GH-releasing peptide-6 (GHRP-6) and GHRP-2 on intracellular adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) levels and GH secretion in ovine and rat somatotrophs. *J Endocrinol* 1996; 14:197-205.
72. Cheng K, Chan WW, Butler B et al. Stimulation of growth hormone release from rat primary pituitary cells by L-692,429, a novel non-peptidyl GH secretagogue. *Endocrinology* 1993; 132:2729-2731.
73. Cunha SR, Mayo KE. Ghrelin and growth hormone (GH) secretagogues potentiate GH-releasing hormone (GHRH)-induced cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production in cells expressing transfected GHRH and GH secretagogue receptors. *Endocrinology* 2002; 143:4570-4582.

74. Hataya Y, Akamizu T, Takaya K et al. A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4552-4555.
75. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9:726-735.
76. Lopez-Illasaca M. Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascade. *Biochem Pharmacol* 1998; 56:269-277.
77. Pearson G, Robinson F, Beers GT et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* 2001; 22:153-183.
78. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999; 13:2905-2927.
79. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296:1655-1657.
80. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005; 9:59-71.
81. Camina JP, Carreira MC, Messari SE, Llorens-Cortes C, Smith RG, Casanueva FF. Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. *Endocrinology* 2004; 145:930-940.

82. Orkin RD, New DI, Norman D et al. Rapid desensitisation of the growth hormone secretagogue (ghrelin) receptor to hexarelin in vitro. *J Endocrinol Invest* 2003; 26:743-747.
83. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402:656-660.
84. Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS et al. Structure and function studies on the new growth hormone releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem* 2000; 43:4370-4376.
85. Torsello A, Ghè C, Bresciani E et al. Short ghrelin peptides neither displace ghrelin binding in vitro nor stimulate GH release in vivo. *Endocrinology* 2002; 143:1968-1971.
86. Muccioli G, Pappoti M, Locatelli V, Ghigo E, Deghenghi R. Binding of ¹²⁵I-labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland. *J Endocrinol Invest* 2001; 24:RC7-RC9.
87. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279:909-913.
88. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Purification and characterization of rat des-Gln¹⁴-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem* 2000; 275:21995-22000.

89. Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem* 2003; 278:64-70.
90. Wajnrach MP, Ten IS, Gertner JM, Eibel RL. Genomic organisation of the human ghrelin gene. *J Endocr Genetics* 2000; 1:231-233.
91. Kishimoto M, Okimura Y, Nakata H et al. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305:186-192.
92. Wei W, Wang G, Qi X, Englander EW, Greeley Jr GH. Characterization and regulation of the rat and human ghrelin promoters. *Endocrinology* 2005; 146:1611-1625.
93. Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM et al. Ghrelin can bind to a species of high-density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem* 2003; 278:8877-8880.
94. Senti M, Tomas M, Fito M et al. Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:5422-5426.
95. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4753-4758.
96. Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley Jr GH. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion:

- enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 2002; 143:185-190.
97. Kanamoto N, Akamizu T, Hosoda H et al. Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4984-4990.
 98. Volante M, Allia E, Fulcheri E et al. Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor growth. *Am J Pathol* 2003; 162:645-654.
 99. Date Y, Kojima M, Hosoda H et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000; 141:4255-4261.
 100. Caminos JE, Gualillo O, Lago F et al. The endogenous growth hormone secretagogue (ghrelin) is synthesized and secreted by chondrocytes. *Endocrinology* 2005; 146:1285-1292.
 101. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407:908-913.
 102. Cumming DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50:1714-1719.
 103. Tschöp M, Wawarta R, Riepl RL et al. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 2001; 24:RC19-RC21.

104. Williams DL, Cummings DE, Grill HJ, Kaplan JM. Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback. *Endocrinology* 2003; 144:2765-2767.
105. Parker BA, Doran S, Wishart J, Horowitz M, Chapman IM. Effects of small intestinal and gastric glucose administration on the suppression of plasma ghrelin concentrations in healthy older men and women. *Clin Endocrinol* 2005; 62:539-546.
106. Bagnasco M, Tulipano G, Melis MR, Argiolas A, Cocchi D, Müller EE. Endogenous ghrelin is an orexigenic peptide acting in the arcuate nucleus in response to fasting. *Regul Pept* 2003; 111:161-167.
107. Sanchez J, Oliver P, Pico C, Palou A. Diurnal rhythms of leptin and ghrelin in the systemic circulation and in the gastric mucosa are related to food intake in rats. *Pflugers Arch* 2004; 448:500-506.
108. Lucidi P, Murdolo G, Di Loreto C et al. Meal intake similarly reduces circulating concentrations of octanoyl and total ghrelin in humans. *J Endocrinol Invest* 2004; 27:RC12-RC15.
109. Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001; 50:707-709.
110. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:240-244.

111. Qi X, Reed J, Englander EW, Chandrashekar V, Bartke A, Greeley Jr GH. Evidence that growth hormone exerts a feedback effect on stomach ghrelin production and secretion. *Exp Biol Med* 2003; 228:1028-1032.
112. Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M et al. Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281:1220-1225.
113. Ariyasu H, Takaya K, Hosoda H et al. Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific ria for the active form of ghrelin. *Endocrinology* 2002; 143:3341-3350.
114. Chan JL, Bullen J, Lee JH, Yiannakouris N, Mantzoros CS. Ghrelin levels are not regulated by recombinant leptin administration and/or three days of fasting in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:335-343.
115. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Oikawa S. Regulation of the ghrelin gene: growth hormone-releasing hormone upregulates ghrelin mRNA in the pituitary. *Endocrinology* 2001; 142:4154-4157.
116. Barkan AL, Dimaraki EV, Jessup SK, Symons KV, Ermolenko M, Jaffe CA. Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2180-2184.
117. Janssen JA, Der Toorn FM, Hofland LJ et al. Systemic ghrelin levels in subjects with growth hormone deficiency are not modified by one year of

- growth hormone replacement therapy. *Eur J Endocrinol* 2001; 145:711-716.
118. Haqq AM, Stadler DD, Jackson RH, Rosenfeld RG, Purnell JQ, LaFranchi SH. Effects of growth hormone on pulmonary function, sleep quality, behavior, cognition, growth velocity, body composition, and resting energy expenditure in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2206-2212.
 119. Tschöp M, Flora DB, Mayer JP, Heiman ML. Hypophysectomy prevents ghrelin-induced adiposity and increases gastric ghrelin secretion in rats. *Obes Res* 2002; 10:991-999.
 120. Caminos JE, Seoane LM, Tovar SA, Casanueva FF, Dieguez C. Influence of thyroid status and growth hormone deficiency on ghrelin. *Eur J Endocrinol* 2002; 147:159-163.
 121. Eden-Engtrom B, Burman P, Holdstock C, Karlsson FA. Effects of growth hormone (GH) on ghrelin, leptin, and adiponectin in GH-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:5193-5198.
 122. Nakagawa E, Nagaya N, Okumura H et al. Hyperglycemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. *Clin Sci* 2002; 103:325-328.
 123. Briatore L, Andraghetti G, Cordera R. Acute plasma glucose increase, but not early insulin response, regulates plasma ghrelin. *Eur J Endocrinol* 2003; 149:403-406.

124. Caixas A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer F, Laferrere B. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1902-1906.
125. Saad MF, Bernaba B, Hwu CM et al. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3997-4000.
126. Lucidi P, Murdolo G, DiLoreto C et al. Ghrelin is not necessary for adequate hormonal counterregulation of insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes* 2002; 51:2911-2914.
127. McCowen KC, Maykel JA, Bistrrian BR, Ling PR. Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic eulycemic conditions in rodents. *J Endocrinol* 2002; 175:R7-R11.
128. Pagotto U, Gambineri A, Pelusi C et al. Testosterone replacement therapy restores normal ghrelin in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4139-4143.
129. Broglio F, Koetsveld PP, Benso A et al. Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:4829-4832.
130. Riis AL, Hansen TK, Moller N, Weeke J, Jorgensen JO. Hyperthyroidism is associated with suppressed circulating ghrelin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:853-857.
131. Arvat E, Maccario M, Di Vito L et al. 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* 2001; 86:1169-1174.

132. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N et al. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4908-4911.
133. Peino R, Baldelli R, Rodriguez-Garcia J et al. Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *Eur J Endocrinol* 2000; 143:R11-R14.
134. Arvat E, Di Vito L, Broglio F et al. Preliminary evidence that ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *J Endocrinol Invest* 2000; 23:493-495.
135. Date Y, Murahashi N, Kojima M et al. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275:477-480.
136. Tannenbaum GS, Bowers CY. Interactions of growth hormone secretagogues and growth hormone-releasing hormone/somatostatin. *Endocrine* 2001; 14:21-27.
137. Tannenbaum GS, Epelbaum J, Bowers CY. Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology* 2003; 144:967-974.
138. Pandya N, DeMottFriberg R, Bowers CY, Barkan AL, Jaffe CA. Growth hormone (GH) releasing peptide-6 requires endogenous hypothalamic GH-releasing hormone for maximal GH stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:1186-1189.

139. Popovic V, Miljic D, Micic D et al. Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:3450-3453.
140. Conley LK, Teik JA, Deghenghi R et al. Mechanism of action of hexarelin and GHRP-6- analysis of the involvement of GHRH and somatostatin in the rat. *Neuroendocrinology* 1995; 61:44-50.
141. Lael-Cerro A, Pumar A, Garcia-Garcia E, Dieguez C, Casanueva FF. Inhibition of growth hormone release after the combined administration of GHRH and GHRP-6 in patients with Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol* 1994; 41:649-654.
142. Wren AM, Small CJ, Fribbens CV et al. The hypothalamic mechanisms of the hypophysiotropic action of ghrelin. *Neuroendocrinology* 2002; 76:316-324.
143. Korbonits M, Little JA, Forsling ML et al. The effect of growth hormone secretaogues and neuropeptide Y on hypothalamic hormone release from acute rat hypothalamic explants. *J Neuroendocrinol* 1999; 11:521-528.
144. Locke W, Kirgis HD, Bowers CY, Abdoh AA. Intracerebroventricular growth-hormone-releasing peptide-6 stimulates eating without affecting plasma growth-hormone responses in rats. *Life Sci* 1995; 56:1347-1352.
145. Torsello A, Luoni M, Schweiger F et al. Novel hexarelin analogs stimulate feeding in the rat through a mechanism not involving growth hormone release. *Eur J Pharmacol* 1998; 360:123-129.

146. Asakawa A, Inui A, Kaga T et al. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 2003; 52:947-952.
147. Nakazato M, Murakami N, Date Y et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409:194-198.
148. Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K et al. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 2001; 50:227-232.
149. Wren AM, Small CJ, Ward HL et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000; 141:4325-4328.
150. Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 2004; 116:337-350.
151. Morton GJ, Schwartz MW. The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *Int J Obesity Relat Metab Disord* 2001; 25 (Suppl 5):S56-S62.
152. Date Y, Murakami N, Toshinai K et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; 123:1120-1128.
153. Ilson BE, Jorkasky DK, Curnow RT, Stote RM. Effect of a new synthetic hexapeptide to selectively stimulate growth hormone release in healthy human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69:212-214.

154. Banks WA, Tschöp M, Robinson SM, Heiman ML. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302:822-827.
155. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004; 428:569-574.
156. Andersson U, Filipsson K, Abbott CR et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 2004; 279:12005-12008.
157. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N et al. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276:905-908.
158. Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280:904-907.
159. Zhang W, Chen M, Chen X, Segura BJ, Mulholland MW. Inhibition of pancreatic protein secretion by ghrelin in the rat. *J Physiol* 2001; 537:231-236.
160. Arosio M, Ronchi CL, Gebbia C, Cappiello V, Beck-Peccoz P, Peracchi M. Stimulatory effects of ghrelin on circulating somatostatin and pancreatic polypeptide levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:701-704.
161. Broglio F, Arvat E, Benso A et al. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5083-5086.

162. Tassone F, Broglio F, Destefanis S et al. Neuroendocrine and metabolic effects of acute ghrelin administration in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:5478-5483.
163. Egido EM, Rodriguez-Gallardo J, Silvestre RA, Marco J. Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *Eur J Endocrinol* 2002; 146:241-244.
164. Colombo M, Gregersen S, Xiao J, Hermansen K. 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* 2003; 27:161-166.
165. Reimer MK, Pacini G, Ahren B. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2003; 144:916-921.
166. Adeghate E, Ponery AS. Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol* 2002; 14:555-560.
167. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S et al. Ghrelin is present in pancreatic α -cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 2002; 51:124-129.
168. Thompson NM, Gill DAS, Davies R et al. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 2004; 145:234-242.
169. Muccioli G, Pons N, Ghè C, Catapano F, Granata R, Ghigo E. Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat

adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol* 2004; 498:27-35.

170. Wren AM, Small CJ, Thomas EL et al. Continuous subcutaneous administration of ghrelin results in accumulation of adipose tissue, independent of hyperphagia or body weight gain. *Endocrine Abstracts* 2004; 7:OC35.
171. Shuto Y, Shibasaki T, Otagiri A et al. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest* 2002; 109:1429-1436.
172. Lowell BB. PPAR γ : an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell* 1999; 99:239-242.
173. Ott V, Fasshauer M, Dalski A et al. Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression. *Horm Metab Res* 2002; 34:640-645.
174. Furuta M, Funabashi T, Kimura F. Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:780-785.
175. Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytan F et al. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 2003; 144:1594-1602.
176. Gualillo O, Caminos JE, Blanco M et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 2001; 142:788-794.

177. Tanaka K, Minoura H, Isobe T et al. Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2335-2340.
178. Hayashida T, Nakahara K, Mondal MS et al. Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. *J Endocrinol* 2002; 173:239-245.
179. Barreiro ML, Gaytan F, Caminos JE et al. Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biol Reprod* 2002; 67:1768-1776.
180. Tena-Sempere M. Exploring the role of ghrelin as novel regulator of gonadal function. *Growth Horm IGF Res* 2005; 15:83-88.
181. Fazio S, Sabatini D, Capaldo B et al. Preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1996; 334:809-814.
182. Bisi G, Podio V, Valetto MR et al. Cardiac effects of hexarelin in hypopituitary adults. *Eur J Endocrinol* 1999; 381:31-38.
183. Broglio F, Benso A, Valetto MR et al. Growth hormone-independent cardiotropic activities of growth hormone-releasing peptides in normal subjects, in patients with growth hormone deficiency, and in patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy. *Endocrine* 2001; 14:105-108.
184. Locatelli V, Rossoni G, Schweiger F et al. Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology* 1999; 140:4024-4031.

185. Berti F, Müller EE, De Gennera Colonna V, Rossoni G. Hexarelin exhibits protective activity against cardiac ischaemia in hearts from growth hormone-deficient rats. *Growth Horm IGF Res* 1998; 8:149-152.
186. De Gennera Colonna V, Rossoni G, Bernareggi M, Müller EE, Berti F. Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin. *Eur J Pharmacol* 1997; 334:201-207.
187. Tivesten A, Bollano E, Caidahl K et al. The growth hormone secretagogue hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. *Endocrinology* 2000; 141:60-66.
188. Bisi G, Podio V, Valetto MR et al. Acute cardiovascular and hormonal effects of GH and hexarelin, a synthetic GH-releasing peptide, in humans. *J Endocrinol Invest* 1999; 22:266-272.
189. Imazio M, Bobbio M, Broglio F et al. GH-independent cardiotropic activities of hexarelin in patients with severe left ventricular dysfunction due to dilated and ischemic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2002; 4:185-191.
190. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M et al. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 2001; 104:1430-1435.
191. Nagaya N, Kangawa K. Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3:146-151.

192. Nagaya N, Miyatake K, Uematsu M et al. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5854-5859.
193. Enomoto M, Nagaya N, Uematsu M et al. Cardiovascular and hormonal effects of subcutaneous administration of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in healthy humans. *Clin Science* 2003; 105:431-435.
194. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M et al. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation* 2001; 104:2034-2038.
195. Torsello A, Bresciani E, Rossoni G et al. Ghrelin plays a minor role in the physiological control of cardiac function in the rat. *Endocrinology* 2003; 144:1787-1792.
196. Muccioli G, Broglio F, Valetto MR et al. Growth hormone-releasing peptides and the cardiovascular system. *Ann Endocrinol (Paris)* 2000; 61:27-31.
197. Bodart V, Bouchard JF, McNicoll N et al. Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ Res* 1999; 85:796-802.
198. Bodart V, Febbraio M, Demers A et al. CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res* 2002; 90:844-849.

199. Andreis PG, Malendowicz LK, Trejter M et al. Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor are expressed in the rat adrenal cortex: evidence that ghrelin stimulates the growth, but not the secretory activity of adrenal cells. *FEBS Lett* 2003; 536:173-179.
200. Pettersson I, Muccioli G, Granata R et al. Natural (ghrelin) and synthetic (hexarelin) GH secretagogues stimulate H9c2 cardiomyocyte cell proliferation. *J Endocrinol* 2002; 175:201-209.
201. Jeffery PL, Herington AC, Chopin LK. The potential autocrine/paracrine roles of ghrelin and its receptor in hormone-dependent cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14:113-122.
202. Mazzocchi G, Neri G, Rucinski M et al. Ghrelin enhances the growth of cultured human adrenal zona glomerulosa cells by exerting MAPK-mediated proliferogenic and antiapoptotic effects. *Peptides* 2004; 25:1269-1277.
203. Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S et al. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 2002; 159:1029-1037.
204. Cassoni P, Ghè C, Marrocco T et al. Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *Eur J Endocrinol* 2004; 150:173-184.
205. Bedendi I, Alloatti G, Marcantoni A et al. Cardiac effects of ghrelin and its endogenous derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln(14)-ghrelin. *Eur J Pharmacol* 2003; 476:87-95.

206. Asakawa A, Inui A, Fujimiya M et al. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* 2005; 54:18-24.
207. Nakai Y, Hosoda H, Nin K et al. Plasma levels of active form of ghrelin during oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2003; 149:R1-R3.
208. Nedvidkova J, Krykorkova I, Bartak IV et al. Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:1678-1682.
209. Tolle V, Kadem M, Bluett-Pajot MT et al. Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:109-116.
210. Marchesini G, Bianchi G, Lucidi P, Villanova N, Zoli M, De Feo P. Plasma ghrelin concentrations, food intake, and anorexia in liver failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2136-2141.
211. Otto B, Cuntz U, Fruehauf E et al. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2001; 145:669-673.
212. Moesgaard SG, Ahren B, Carr RD, Gram DX, Brand CL, Sundler F. Effects of high-fat feeding and fasting on ghrelin expression in the mouse stomach. *Reg Peptides* 2004; 120:261-267.
213. Cumming DE, Weigle DS, Frayo RS et al. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2002; 346:1623-1630.

214. Hansen TK, Dall R, Hosoda H et al. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol* 2002; 56:203-206.
215. Pöykkö SM, Kellokoski E, Hörkkö S, Kauma H, Kesäniemi A, Ukkola O. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52:2546-2553.
216. Corbetta S, Peracchi M, Cappiello V et al. Circulating ghreline levels in patients with pancreatic and gastrointestinal neuroendocrine tumors: identification of one pancreatic ghrelinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:3117-3120.
217. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD et al. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerosis lesion development in mice. *J Clin Invest* 2000; 105:1049-1056.
218. Nicholson AC. Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis. The role of lipid regulation of PPAR γ signaling. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14:8-12.
219. Linton MF, Fazio S. Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Intern J Obes* 2003; 27:S35-S40.
220. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233-241.
221. Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ et al. Disruption of 12/15-lipoxygenase diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 1999; 103:1597-1604.
222. Harats D, Shaish A, George J et al. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL

- receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2100-2105.
223. Dong Z, Chapman S, Brown A, Frenette P, Hynes R, Wagner D. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1998; 102:145-152.
224. Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM-1) deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 2000; 191:189-194.
225. Gu L, Okada Y, Clinton SK et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 1998; 2:275-281.
226. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998; 394:894-897.
227. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:8264-8268.
228. Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK et al. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol* 1997; 150:1687-1699.
229. Schmidt-Ott KM, Kagiya S, Phillips MI. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Reg Peptides* 2000; 93:65-77.

230. Negoro N, Kanayama Y, Haraguchi M et al. Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells in vivo. An autocrine mechanism promoting hypertensive vascular hypertrophy. *J Clin Invest* 1995; 95:1140-1150.
231. Ericson K, Saldeen TG, Lindquis O, Pahlson C, Mehta JL. Relationship of *Chlamydia pneumoniae* infection with severity of human coronary atherosclerosis. *Circulation* 2000; 101:2568-2571.
232. Streblov DN, Soderberg-Naucler C, Vieira J et al. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell* 1999; 99:511-520.
233. Guevara NV, Kim HS, Antonova EL, Chan L. The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nature Med* 1999; 5:335-339.
234. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* 2001; 104:503-516.
235. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004; 84:767-801.
236. Weiss D, Kools JJ, Taylor R. Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation* 2001; 103:448-454.
237. Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1989; 13:305-314.

238. Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1988; 62:749-756.
239. Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Ziegler A, der Leyen HE, Dzau VJ. A novel role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Clin Invest* 1999; 104:815-823.
240. Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI et al. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:940-948.
241. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griending KK. p38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1998; 273:15022-15029.
242. Xi XP, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:73-82.
243. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG et al. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 1995; 375:247-250.
244. Inagami T, Eguchi S. Angiotensin II-mediated vascular smooth muscle cell growth signaling. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33:619-624.

245. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs hyperplasia: autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1992; 90:456-461.
246. Hamaguchi A, Kim S, Izumi Y, Zhan Y, Yamanaka S, Iwao H. Contribution of extracellular signal-regulated kinase to angiotensin II-induced transforming growth factor-beta 1 expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1999; 34:126-131.
247. Deguchi J, Makuuchi M, Nakaoka T, Collins T, Takuwa Y. Angiotensin II stimulates platelet-derived growth factor-B chain expression in newborn rat vascular smooth muscle cells and neointimal cells through Ras, extracellular signal-regulated protein kinase, and c-Jun N-terminal protein kinase mechanisms. *Circ Res* 1999; 85:565-574.
248. Naftilan AJ, Pratt RE, Dzau VJ. Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expression by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83:1419-1424.
249. Nakahara K, Nishimura H, Kuro O et al. Identification of three types of PDGF-A chain gene transcripts in rabbit vascular smooth muscle and their regulated expression during development and by angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 184:811-818.
250. Delafontaine P, Lou H. Angiotensin II regulates insulin-like growth factor I gene expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1993; 268:16866-16870.

251. Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1993; 91:2268-2274.
252. Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* 1996; 79:748-756.
253. Stiko-Rahm A, Hultgardh-Niosson A, Regnstrom J, Hamsten A, Nilsson J. Native and oxidized LDL enhances production of PDGF-AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arterioscl Thromb* 1992; 12:1099-1109.
254. Zwijsen RM, Japenga SC, Heijen AM, Van den Bos RC, Koeman JH. Induction of platelet-derived growth factor chain A gene expression in human smooth muscle cells by oxidized low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186:1410-1416.
255. Raines EW, Dower SK, Ross R. Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science* 1989; 243:393-396.
256. Majack RA, Majesky MW, Goodman LV. Role of PDGF-A expression in the control of vascular smooth muscle cell growth by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 1990; 111:239-247.
257. Stouffer GA, Owens GK. TGF-beta promotes proliferation of cultured SMC via both PDGF-AA-dependent and PDGF-AA-independent mechanisms. *J Clin Invest* 1994; 93:2048-2055.

258. Winkles JA, Gay CG. Regulated expression of PDGF A-chain mRNA in human saphenous vein smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180:519-524.
259. Hughes AD, Clunn GF, Refson J, Demoliou-Mason C. Platelet-derived growth factor (PDGF): actions and mechanisms in vascular smooth muscle. *Gen Pharmac* 1996; 27:1079-1089.
260. Raines EW. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15:237-254.
261. Steinberg D. A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis* 1997; 131 Suppl:S5-S7.
262. Newby AC, George SJ. Proliferation, migration, matrix turnover, and death of smooth muscle cells in native coronary and vein graft atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol* 1996; 11:574-582.
263. Chatterjee S. Role of oxidized human plasma low density lipoproteins in atherosclerosis: effects on smooth muscle cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 1992; 111:143-147.
264. Auge N, Pieraggi MT, Thiers JC, Negre-Salvayre A. Proliferative and cytotoxic effects of mildly oxidized low density lipoproteins on vascular smooth muscle cells. *Biochem J* 1995; 309:1015-1020.
265. Yang CM, Chien CS, Hsiao LD et al. Mitogen effect of oxidized low-density lipoprotein on vascular smooth muscle cells mediated by activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway. *Br J Pharmacol* 2001; 132:1531-1541.

266. Velarde V, Jenkins AJ, Christopher J, Lyons TJ, Jaffa AA. Activation of MAPK by modified low-density lipoproteins in vascular smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 2001; 91:1412-1420.
267. Chien MW, Chien CS, Hsiao LD, Lin CH, Yang CM. oxLDL induces mitogen-activated protein kinase activation mediated via PI3-kinase/Akt in vascular smooth muscle cells. *J Lipid Res* 2003; 44:1667-1675.
268. Marx N, Schonbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998; 83:1097-1103.
269. Law RE, Goetze S, Xi XP et al. Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2000; 101:1311-1318.
270. Goetze S, Xi XP, Kawano H et al. PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33:798-806.
271. Law RE, Meehan WP, Xi XP et al. Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J Clin Invest* 1996; 98:1897-1905.
272. Graf K, Xi XP, Hsueh WA, Law RE. Troglitazone inhibits angiotensin II-induced DNA synthesis and migration in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1997; 400:119-121.
273. Sugawara A, Takeuchi K, Uruno A et al. Transcriptional suppression of type 1 angiotensin II receptor gene expression by peroxisome

- proliferator-activated receptor- γ in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 2001; 142:3125-3134.
274. Goetze S, Xi XP, Graf K, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Troglitazone inhibits angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 nuclear translocation and activation in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1999; 452:277-282.
275. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ activators downregulate angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2000; 102:1834-1839.
276. Fukuda N, Hu WY, Teng J et al. Troglitazone inhibits growth and improves insulin signaling by suppression of angiotensin II action in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Atherosclerosis* 2002; 163:229-239.
277. Tham DM, Martin-McNulty B, Wang YX et al. Angiotensin II is associated with activation of NF- κ B mediated genes and downregulation of PPARs. *Physiol Genomics* 2002; 11:21-30.
278. Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997; 272:10811-10816.
279. Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor γ is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* 1997; 272:5128-5132.

280. Ross R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126.
281. Kranzhofer R, Browatzki M, Schmidt J, Kubler W. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257:826-828.
282. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Konig S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res* 2000; 86:1266-1272.
283. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:645-651.
284. Liao F, Andalibi A, Qiao JH, Allayee H, Fogelman AM, Lusis AJ. Genetic evidence for a common pathway mediating oxidative stress, inflammatory gene induction, and aortic fatty streak formation in mice. *J Clin Invest* 1994; 94:877-884.
285. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998; 83:952-959.
286. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kubler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1623-1629.

287. Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res* 1999; 84:695-703.
288. Sasayama S, Okada M, Matsumori A. Chemokines and cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2000; 45:267-269.
289. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors as the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 2000; 49:497-505.
290. Tham DM, Wang YX, Rutledge JC. Modulator of vascular inflammation by PPARs. *Drug News Perspect* 2003; 16:109-116.
291. Neve BP, Fruchart JC, Staels B. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1245-1250.
292. Krieger M, Acton S, Ashkenas J, Pearson A, Penman M, Resnick D. Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem* 1993; 268:4569-4972.
293. Febbraio M, Hajjar DP, Silvertstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2001; 108:785-791.
294. Zingg JM, Ricciarelli R, Andorno E, Azzi A. Novel 5' exon of scavenger receptor CD36 is expressed in cultured human vascular smooth muscle

- cells and atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:412-417.
295. Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP et al. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* 1999; 274:19055-19062.
296. Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem* 1997; 272:21654-21659.
297. Nagy L, Tontonez P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell* 1998; 93:229-240.
298. Tontonez P, Nagy L, Alvarez JL, Thomazy VA, Evans RM. PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998; 93:241-252.
299. Feng J, Han J, Pearce SFA et al. Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR γ . *J Lipid Res* 2000; 41:688-696.
300. Zhao M, Liu Y, Wang X, New L, Han J, Brunk TU. Activation of the p38 MAP kinase pathway is required for foam cell formation from macrophages exposed to oxidized LDL. *APMIS* 2002; 110:458-468.
301. Jackson SM, Parhami F, Xi XP et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-

- endothelial cell interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:2094-2104.
302. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391:79-82.
303. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:4318-4323.
304. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta-12,14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 1995; 83:803-812.
305. Ricote M, Huang J, Fajas L et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:7614-7619.
306. Yesner LM, Huh HY, Pearce SF, Silverstein RL. Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:1019-1025.
307. Huang JT, Welch JS, Ricote M et al. Interleukin-4 dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 1999; 400:378-382.

308. Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML et al. The role of PPAR- γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med* 2001; 7:41-47.
309. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonez P, Evans RM. PPAR- γ dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 2001; 7:48-52.
310. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH et al. A PPAR γ -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 2001; 7:161-171.
311. Tontonez P, Hu E, Spiegelman B. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5:571-576.
312. Collins AR, Meehan WP, Kintscher U et al. Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:365-371.
313. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2000; 106:523-531.
314. Chen Z, Ishibashi S, Perrey S et al. Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:372-377.

315. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V et al. PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cell through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 2001; 7:53-58.
316. Katugampola SD, Kuc RE, Maguire JJ, Davenport AP. G-protein-coupled receptors in human atherosclerosis: comparison of vasoconstrictors (endothelin and thromboxane) with recently de-orphanized (urotensin-II, apelin and ghrelin) receptors. *Clin Science* 2002; 103(Suppl 48):171S-175S.
317. Okumura H, Nagaya N, Enomoto M, Nakagawa E, Oya H, Kangawa K. Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 39:779-783.
318. Wiley KE, Davenport AP. Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1. *Brit J Pharmacol* 2002; 136:1146-1152.
319. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-415.
320. Fanco Cereceda A. Endothelin- and neuropeptide Y-induced vasoconstriction of human epicardial coronary arteries in vitro. *Br J Pharmacol* 1989; 97:968-972.
321. Haynes WG, Ferro CJ, O'Kane KP, Somerville D, Lomax CC, Webb DJ. Systemic endothelin receptor blockage decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. *Circulation* 1996; 93:1860-1870.

322. Bacon CR, Cary NR, Davenport AP. Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic coronary artery. *Circ Res* 1996; 79:794-801.
323. Lerman A, Hildebrand FL, Aarhus LL, Burnett JC. Endothelin has biological actions at pathophysiological concentrations. *Circulation* 1991; 83:1808-1814.
324. Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T, Sugishita Y, Suzuki N. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet* 1989; 2:53-54.
325. Yasuda M, Kohno M, Tahara A et al. Circulating immunoreactive endothelin in ischemic heart disease. *Am Heart J* 1990; 119:801-806.
326. Wiley KE, Davenport AP. Nitric oxide-mediated modulation of the endothelin-1 signalling pathway in the human cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2001; 132:213-220.
327. Nishida K, Harrison DG, Navas JP et al. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1992; 90:2092-2096.
328. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000; 190:244-254.
329. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;(1774):1777.

330. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
331. De Caterina R, Libby P, Peng HB et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96:60-68.
332. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 38:87-104.
333. Shimizu Y, Nagaya N, Teranishi Y et al. Ghrelin improves endothelial dysfunction through growth hormone-independent mechanisms in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310:830-835.
334. Rossoni G, Locatelli V, De Gennera Colonna V et al. Growth hormone and hexarelin prevent endothelial vasodilator dysfunction in aortic rings of the hypophysectomized rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34:454-460.
335. Gibbons GH. Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: a new therapeutic target. *Am J Cardiol* 1997; 79:3-8.
336. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999; 399:597-601.
337. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399:601-605.

338. Li WG, Gavrilu D, Liu X et al. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kB activation in human endothelial cells. *Circulation* 2004; 109:2221-2226.
339. Loffreda S. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 1998; 12:57-65.
340. Hu Q, Klippel A, Muslin AJ, Fantl WJ, Williams LT. Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science* 1995; 268:100-102.
341. Krasilnikov MA. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry* 2000; 65:59-67.
342. Kozikowski AP, Sun H, Brognard J, Dennis PA. Novel PI analogues selectively block activation of the pro-survival serine/threonine kinase Akt. *J Am Chem Soc* 2003; 125:1144-1145.
343. Zhang W, Zhao L, Lin TR et al. Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Mol Biol Cell* 2004; 15:2484-2491.
344. Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun J, Harp JB, Ling BN. Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 1997; 272:24684-24690.
345. Kusuhara M, Takahashi E, Peterson TE et al. p38 kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle

- cells: effect on Na⁺/H⁺ exchange and ERK1/2. *Circ Res* 1998; 83:824-831.
346. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 1994; 269:5241-5248.
347. Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 1999; 253:210-229.
348. Vantler M, Caglayan E, Zimmermann WH, Baumer AT, Rosenkranz S. Systematic evaluation of anti-apoptotic growth factor signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005; 280:14168-14176.
349. Castillo SS, Brognard J, Petukhov PA et al. Preferential inhibition of Akt and killing of Akt-dependent cancer cells by rationally designed phosphatidylinositol ether lipid analogues. *Cancer Res* 2004; 64:2782-2792.
350. Lymn JS, Gallagher KL, Clunn GF, Fexby SE, Patel MK, Hughes AD. PDGF stimulates DNA synthesis in human vascular smooth muscle cells via a novel wortmannin-insensitive phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Lett* 2003; 555:591-596.
351. Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Kume K, Shomosegawa T. Differential roles of signaling pathways for proliferation and migration of rat pancreatic stellate cells. *Tohoku J Exp Med* 2003; 199:69-84.
352. Adachi M, Katsumura KR, Fujii K, Kobayashi S, Aoki H, Matsuzaki M. Proteasome-dependent decrease in Akt by growth factors in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 2003; 554:77-80.

353. Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (Protein kinase B). *Science* 1999; 286:1741-1744.
354. Reusch HP, Zimmermann S, Schaefer M, Paul M, Moelling K. Regulation of Raf by Akt controls growth and differentiation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001; 276:33630-33637.
355. Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Wetzker R. Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase γ . *Science* 1997; 275:394-397.
356. Rodriguez-Viciana P, Marte BM, Warne PH, Downward J. Phosphatidylinositol 3' kinase: one of the effectors of Ras. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1996; 351:225-231.
357. Stoneman VEA, Bennett MR. Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications. *Clin Science* 2004; 107:343-354.
358. Aga M, Watters JJ, Pfeiffer ZA, Wiepz GJ, Sommer JA, Bertics PJ. Evidence for nucleotide receptor modulation of cross talk between MAP kinase and NF-kappa B signaling pathways in murine RAW 264,7 macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286:C923-C930.
359. Mayo KE, Miller T, DeAlmeida V, Godfrey P, Zheng J, Cunha SR. Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55:237-267.
360. Cell Signaling Technology. Product pathways - MAPK signaling. <<http://www.cellsignal.com>>. Catalogue 2002. Reproduit par Dr Jae-Won Soh. <<http://www.pkclab.org/pkc/pkcbiology/map>> Sans date (consulté en septembre 2005).

361. Cell Signaling Technology. G-protein coupled receptor signaling to MAPK/ERK. <<http://www.cellsignal.com>>. Catalogue 2002. Reproduit par Anonyme. <<http://focosi.altervista.org/gpcrmapkmap.html>> Sans date (consulté en septembre 2005).
362. Sambrano GR and Sunahara R. Sans titre. Alliance for cellular signaling <www.afcs.org> Sans date (consulté le 15 janvier 2005).
363. Anonyme. Sans titre. <http://server.activeweb.pl/images/atherosclerosis_damage.jpg> Sans date (consulté en septembre 2005).

