

2m11.3021.2

Université de Montréal

**ISOLEMENT DE L'ADN COMPLÉMENTAIRE DE LA
GHRELINÉ PORCINE ET ESSAIS EN TRANSFECTION *IN VIVO*
AVEC LA GHRELINÉ ET LA SOMATOCRININE PORCINE**

par

JUSTIN ROUSSELLE

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option biomédecine

Août, 2001

©Justin Rousselle, 2001



SF
607
U54
2002
v.015

Handwritten notes or a signature, possibly including the word "RECEIVED" or similar, which is mostly illegible due to fading.

RECEIVED
FEB 14 2002
U.S. DEPARTMENT OF JUSTICE
FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION

()

()

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**ISOLEMENT DE L'ADN COMPLÉMENTAIRE DE LA
GHRELININE PORCINE ET ESSAIS EN TRANSFECTION *IN VIVO*
AVEC LA GHRELININE ET LA SOMATOCRININE PORCINE**

présenté par

JUSTIN ROUSSELLE

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Jean Sirois, président du jury

Pascal Dubreuil, directeur de recherche

Christopher Price, codirecteur de recherche

Dan Lacroix, membre du jury

Mémoire accepté le 10 juin 2002

SOMMAIRE

L'administration du facteur de relâche de la somatotrophine (ST), ou GRF, engendre une hausse de la ST qui mène à des effets anaboliques se résumant en une diminution de gras et en une augmentation de la masse musculaire chez des porcs recevant le traitement. Cette administration de GRF doit se faire continuellement et la transfection *in vivo* apporterait une solution à ce besoin en apport continu. La transfection *in vivo* permet la synthèse endogène de peptides suite à une incorporation d'un vecteur d'expression comprenant l'ADNc du peptide en question.

Le nouveau peptide de 27 à 28 acides aminés récemment décrit chez l'humain et le rat, nommé ghrelina, est aussi un sécrétagogue de la ST. La ghrelina a la particularité d'être octanoylée sur la sérine en position 3 ce qui lui confère son activité somatotrope. Ce peptide s'avère en fait la molécule endogène des sécrétagogues synthétiques de la ST (ou ssST) qui ont été très bien décrits depuis le début des années 1980. Il est d'autant plus remarquable que la ghrelina, comme ses prédécesseurs synthétiques, agit en synergie avec le GRF sur la sécrétion de la ST.

Ainsi, nous avons réussi l'isolement de l'ADNc de la ghrelina(1-27) chez le porc (pGhrelin Δ Q¹⁴) pour l'intégrer à un vecteur d'expression eucaryote, agissant sous le promoteur CMV, appelé pCMV. En combinaison avec un deuxième vecteur pCMV contenant l'ADNc du GRF porcin (pGRF), nous avons procédé à des transfections *in vitro* et *in vivo*.

Les transfections *in vitro* avec pCMV_pGRF ont conduit à une sécrétion significative de pGRF immunoréactif. Toutefois, les transfections *in vitro* réalisées avec pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ n'ont pas mené à une sécrétion significative de ghrelina octanoylée.

Nous avons évalué deux dispositifs d'administration de l'ADN, soient la spermidine et le DOTAP-Cl, dans des transfections *in vivo* combinés avec l'évaluation de quatre modes d'administration, soient l'injection par voie intramusculaire, par voie intraveineuse, par voie intraveineuse à fort volume (principe d'hydrodynamisme) et par électrotransfert génique (GET). Aucune transfection *in vivo* chez la souris et / ou le rat n'a mené à une expression significative de peptide transfecté (pGRF), n'a engendré de stimulation de la sécrétion de la ST ou n'a mené à des effets anaboliques. L'expression de l'ARN messager de ces vecteurs n'a pas exclusivement été détectée, cependant, l'ADN de transfection peut demeurer dans les tissus transfectés pour plus de 17 à 21 jours et confirme que la technique de transfection *in vivo* n'est pas à point mais qu'elle détient une solide base d'application.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des sigles et des abréviations	xiii
REMERCIEMENTS	xvi
DÉDICACE	xvii
1. INTRODUCTION	1
2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE	4
2.1. LES SÉCRÉTAGOGUES DE LA SOMATOTROPHINE (SST)	4
2.1.1. LA SOMATOCRININE (GRF)	4
2.1.2. LES SÉCRÉTAGOGUES SYNTHÉTIQUES DE LA SOMATOTROPHINE (SSST)	5
2.1.3. LA GHRELININE	7
2.2. EFFET SYNERGIQUE DE LA GHRELININE ET DE LA SOMATOCRININE SUR LA LIBÉRATION DE ST	16
2.3. TRANSFECTION <i>IN VIVO</i>	18
2.4. HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	27
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES	28

3.1. ISOLEMENT DEL'ADNc DE LA SOMATOCRININE PORCINE ET INCORPORATION DANS pCMV	28
3.2. ISOLEMENT DEL'ADNc DE LA GHRELININE PORCINE ET INCORPORATION DANS pCMV	29
3.2.1. ISOLEMENT DE LA GHRELININE PORCINE	29
3.2.1.1. Récolte de tissus	29
3.2.1.2. Isolement de l'ARN total	29
3.2.1.3. Synthèse d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) par rétrotranscriptase (RT)	30
3.2.1.4. Amplification en chaîne par polymérase (ACP)	30
3.2.1.4.1. Synthèse d'amorces	31
3.2.1.4.2. 1 ^{ière} étape : ACP basée sur l'homologie humaine	32
3.2.1.4.3. 2 ^{ème} étape : ACP semi-emboîtée	33
3.2.1.4.4. 3 ^{ème} étape : 3' RACE et 5' RACE	33
3.2.1.4.5. 4 ^{ème} étape : clonage de l'ADNc de la ghrelin porcine	34
3.2.2. INCORPORATION DE L'ADNc DE LA GHRELININE PORCINE DANS pCMV	35
3.2.3. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE COMMUNES ET PARTAGÉES DANS PLUSIEURS SECTIONS	37
3.2.3.1. Purification sur colonne des produits d'amplification ..	37
3.2.3.2. Purification sur colonne des fragments d'ADN isolés sur gel d'agarose	38
3.2.3.3. Gel d'agarose	38

3.2.3.4.	Spectroscopie par absorbance	39
3.2.3.5.	Séquençage	39
3.2.3.6.	Incorporation de fragments d'ADNc dans pGEM®-T Easy	40
3.2.3.7.	Milieu de culture LB et LB Agar	40
3.2.3.8.	Transformation	41
3.2.3.9.	Criblage de clones	41
3.2.3.9.1.	<i>Clones compris dans pCMV</i>	41
3.2.3.9.2.	<i>Clones compris dans pGEM®-T Easy</i>	42
3.2.3.10.	Digestion par endonucléases	42
3.2.3.11.	Préparations d'ADN plasmidique (Mini-prep et Giga-prep)	42
3.3.	TRANSFECTION <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i>	44
3.3.1.	TRANSFECTION <i>IN VITRO</i>	44
3.3.1.1.	pGRF	44
3.3.1.2.	pGhrelin Δ Q ¹⁴	44
3.3.2.	TRANSFECTION <i>IN VIVO</i>	45
3.3.2.1.	Mode d'administration	45
3.3.2.1.1.	<i>Intramusculaire</i>	45
3.3.2.1.2.	<i>Électrotransfert génique (GET)</i>	46
3.3.2.1.3.	<i>Intraveineux</i>	47
3.3.2.1.4.	<i>Transfection par hydrodynamisme (HD)</i>	47
3.3.2.2.	Dispositifs d'administration	48
3.3.2.2.1.	<i>Spermidine</i>	48

3.3.2.2.2.	<i>DOTAP</i>	48
3.3.2.3.	Animaux	49
3.3.2.3.1.	<i>Souris</i>	49
3.3.2.3.2.	<i>Rats</i>	52
3.4.	ANALYSES	55
3.4.1.	RIA	55
3.4.1.1.	Ghrelin	55
3.4.1.2.	GRF (humain)	55
3.4.1.3.	Somatotrophine de rat (rST)	56
3.4.1.3.1.	<i>Préparation du traceur ; marquage de la rST avec ¹²⁵I</i>	57
3.4.1.4.	Comptage des échantillons RIA	58
3.4.2.	RT-ACP	59
3.4.2.1.	ADNc du pGRF	59
3.4.2.2.	ADNc de la ghreline et de la ghreline Δ Q ¹⁴ porcines ...	59
3.5.	ANALYSES STATISTIQUES	60
4.	RÉSULTATS	61
4.1.	CLONAGE DE L'ADNC DE LA GHRELIN ET DE LA GHRELIN DÉS-GLN¹⁴ PORCINES	61
4.2.	TRANSFECTION <i>IN VITRO</i>	64
4.3.	TRANSFECTION <i>IN VIVO</i>	66
4.3.1.	EXPÉRIENCE I : ÉVALUATION DE LA TRANSFECTION CHEZ LA SOURIS AVEC DEL'ADN NU DE pCMV_pGRF OU AVEC pCMV_pGRF AVEC SPERMIDINE	66

4.3.2.	EXPÉRIENCE II : EXPLORATION DE TROIS VOIES D'ADMINISTRATION POUR LA TRANSFECTION CHEZ LA SOURIS AVEC DE L'ADN NU DE pCMV_pGRF OU AVEC pCMV_pGRF AVEC DOTAP	68
4.3.3.	EXPÉRIENCE III : ÉVALUATION DE L'ÉLECTROTRANSFERT GÉNIQUE (GET) CHEZ LE RAT AVEC DE L'ADN NU DE pCMV_pGRF ET / OU pCMV_pGHRELIN Δ Q ¹⁴	70
5.	DISCUSSION	76
5.1.	ISOLEMENT DE L'ADNC DE LA GHRELINE PORCINE	76
5.2.	TRANSFECTION <i>IN VITRO</i>	81
5.3.	TRANSFECTION <i>IN VIVO</i>	84
	EXPÉRIENCE I	84
	EXPÉRIENCE II	85
	EXPÉRIENCE III	87
6.	CONCLUSION	93
	BIBLIOGRAPHIE	96

LISTE DES TABLEAUX

tableau I : Concentrations de pGRF plasmatique et poids des souris transfectées par voie i.m. avec pCMV pGRF \pm spermidine au jour 7 suivant les traitements 67

tableau II : Poids des rats électrotransfectées (GET) avec pCMV pGhrelin Δ Q¹⁴ ou pCMV pGRF, seul ou en combinaison sur une période de 17 jours. 72

tableau III : Concentrations plasmatiques de somatotrophine (rST) chez des rats électrotransfectés (GET) avec pCMV pGhrelin Δ Q¹⁴ ou pCMV pGRF, seul ou en combinaison. 72

LISTE DES FIGURES

figure 1 : <u>Représentation de la ghreline de rat.</u>	7
figure 2 : <u>Séquence des amorces utilisées dans les amplifications de l'ADNc de la ghreline porcine et représentation de la position relative de chacune des amorces par rapport à cette ADNc.</u>	32
figure 3 : <u>Diagramme de synthèses alternatives de pCMV pGhrelin et de pCMV pGhrelinΔQ¹⁴.</u>	36
figure 4 : <u>Représentation de la manipulation d'électrotransfert génique (GET) intramusculaire.</u>	46
figure 5 : <u>Séquence complète de l'ADNc de la préproghreline porcine.</u>	61
figure 6 : <u>Représentation de l'agencement des séquences dans les vecteurs plasmidiques pCMV contenant les ADNc pGhrelin, pGhrelinΔQ¹⁴ et pGRF.</u>	62
figure 7 : <u>Concentrations de pGRF immunoréactif présent dans les milieux de cultures cellulaires eucaryotes suite à des transfections <i>in vitro</i> avec pCMV pGRF.</u>	65
figure 8 : <u>Suivi de la croissance pendant 21 jours et niveau de pGRF immunoréactif plasmatique au jour 21 suite à une transfection <i>in vivo</i> avec pCMV pGRF chez la souris mâle en croissance.</u>	69

figure 9 : Profil de somatotrophine et suivi du poids chez le rat adulte mâle et femelle suite à une électrotransfection génique (GET) *in vivo* avec pCMV pGhrelin Δ Q¹⁴et/ou pCMV pGRF. 71

figure 10 : Exemples de RT-ACP et ACP contrôles pouvant démontrer l'expression d'ARNm de pGRF après transfection *in vivo* et de la pGhrelin après transfection *in vitro* et *in vivo*. 75

figure 11: Homologie de séquences en acides aminés de la préproghreline chez l'humain, le porc, le bovin, le chien, le rat et la souris. 77

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

#cat	# de catalogue
A ₂₆₀	absorbance à 260 nm
A ₂₈₀	absorbance à 280 nm
ACP	amplification en chaîne par polymérase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNtot	ARN total
BLV	«Bovine Leukemia Virus» - virus de la leucémie bovine
BSA	«bovine serum albumin» - albumine bovine
CMV	cytomégalovirus
cpm	compte par minute
CST	cortistatine
dH ₂ O	eau distillée
DOTAP / DOTAP-Cl	N-[1-(2,3-dioléoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium / chlorure de ...
e.g.	<i>Exempli gratia</i> - par exemple
EDTA	«ethylenediaminetetraacetic acid» - acide éthylènediaminetétraacétique
GET	«Gene Electrotransfer» - électrotransfert de gène
GH ou ST	«Growth Hormone» - somatotrophine
GHRP	«Growth Hormone-Releasing Peptide(s)» - peptide(s) à activité libératrice de la ST
GHS	«GH Secretagogue(s)» - sécrétagogue(s) de la ST
GHS-r / GHS-r1a	«GHS receptor» - récepteur GHS / type 1a

GRF	«Growth Hormone-Releasing Factor» - somatocrinine
HD	hydrodynamisme
hGhrelin / hGhreline	ghreline humaine
i.e.	<i>In explicata</i> - c'est-à-dire
i.m.	intramusculaire
i.p.	intrapéritonéal
i.v.	intraveineux
IGF (IGF-I, IGF-II)	«Insulin-like Growth Factor I, II» - facteur de croissance insulinique I, II
INF- γ	interféron- γ
LB	Luria Bertani
MTLRP	«motilin-related peptide» - peptide similaire à la motiline
NPY	neuropeptide-Y
NSB	«non specific binding» - liaison non-spécifique
nt	nucléotides
p/v	ratio poids/volume (g/mL)
pb	paire de base
PBS	«phosphate-buffered saline» - tampon phosphate salin
PCR	«Polymerase Chain Reaction» - amplification en chaîne par polymérase, ACP
pGhrelin / pGhreline	ghreline porcine
pGhrelin Δ Q ¹⁴	ghreline porcine dés-Gln ¹⁴ (désamino-glutamine 14)
pGRF	somatocrinine porcine
RACE	«Rapid Amplification of cDNA Ends» - amplification rapide des extrémités (3' et 5') d'ADNc
rGhrelin	Ghreline de rat
RIA	«radioimmunoassay» - radio-immunodosage
rpm	révolutions par minute
RT	rétrotranscriptase

RT-ACP	une RT suivi d'une ACP
s	seconde
SS	somatostatine
ssST	sécrétagogue(s) synthétique(s) de la somatotrophine
sST	sécrétagogue(s) de la somatotrophine
ST	somatotrophine
TAE	tris-acétate EDTA
UV	ultra-violet

REMERCIEMENTS

Je remercie grandement mon directeur de maîtrise, D^r Pascal Dubreuil, qui m'a donné cette unique opportunité de compléter de telles études. Je tiens à dire qu'il s'est trouvé disponible et qu'il est allé de bons conseils pour m'inculquer la culture de la recherche.

De même, je remercie mon co-directeur, D^r Christopher A. Price, pour sa contribution et ses conseils utiles.

Je remercie D^r Dan Lacroix qui a su prendre le temps de me guider aux moments opportuns et dont la participation à ce projet est notable.

Je tiens également à souligner la contribution des gens de la compagnie Olier Grisé et fils Ltée. Grâce à M Stéphane Grisé, ce projet a pu être réalisé.

Un remerciement important est offert aussi aux gens qui ont contribué directement ou indirectement à ce travail, de part leurs soutiens techniques et leurs conseils, soient aux D^r Jean Sirois et Bruce D. Murphy et leurs équipes ainsi qu'au groupe de recherche du CRRA qui m'a fourni locaux et équipement pour mes travaux. Sans eux, biens des étapes auraient faillies.

De plus, je veux remercier, de ma plus grande sincérité, ma conjointe Caroline, ainsi que ma famille, pour le soutien qu'ils m'ont tous assuré.

DÉDICACE

À cette sage et grande dame, qui nous aime toujours et encore et dont la fierté qu'elle a pour nous est inégalable. Grand-Maman Bernadette, je vous dédie cet ouvrage en gage de reconnaissance pour tout ce que vous avez réalisé pour nous.

1. INTRODUCTION

L'hormone de croissance, ou somatotrophine (ST), orchestre en partie le métabolisme de la croissance par l'entremise des facteurs de croissances insuliniques ou «insuline-like growth factor» I et II (IGF-I et IGF-II). Cette hormone de l'adénohypophyse gère à la fois la différenciation cellulaire et la croissance corporelle par ses actions sur le métabolisme des protéines, des lipides et des hydrates de carbones, en plus de régulariser la balance eau - électrolytes (60). La ST peut être prise en défaut directement ou indirectement dans des anomalies connues telles que le gigantisme et le nanisme ou encore l'acromégalie et la somatopause. Sa synthèse et sa sécrétion varient selon le sexe, l'âge, l'état de satiété et le cycle circadien (révisé dans 33). Aussi, les effets anaboliques de la ST chez plusieurs espèces, dont l'humain (45) et plusieurs animaux de consommation (33, 45), sont très bien décrits et documentés (17, 31, 33, 45). Elle joue un rôle majeur dans la répartition des nutriments entre les tissus adipeux et les tissus musculaires, où elle favorise la lipolyse et l'intégration des acides aminés tout en diminuant le catabolisme protéique (45). C'est pourquoi la somatotrophine représente une hormone clef dans l'industrie de la production animale. Ses effets zootechniques d'importance sont attirants par sa capacité à augmenter, principalement chez les monogastriques, la masse musculaire qui se produit en parallèle avec une réduction du contenu en gras (45).

Jusqu'à tout récemment, il a été généralement admis que le contrôle endocrinien de la sécrétion de la ST se faisait via l'interaction de deux facteurs hypothalamiques : la somatostatine (SS) et la somatocitrine (GRF) (99). La somatostatine est en mesure d'inhiber la sécrétion de ST stimulée par le GRF par un mécanisme non compétitif et séparé de celui du GRF (32). D'autres mécanismes de régulation de la ST passent par des inhibitions

rétroactives sur l'hypothalamus et l'hypophyse via les concentrations de ST, d'IGF-I et de GRF et via l'expression des récepteurs de chacune des hormones respectives (45).

Ainsi, le GRF est reconnu comme étant l'hormone endogène maîtresse capable de stimuler la sécrétion de ST et est ainsi appelée un sécrétagogue endogène de la ST. Toutefois, d'autres substances synthétiques possèdent une activité libératrice sur la ST et ont été nommées de façon générale sécrétagogues synthétiques de la ST, ou ssST. Le mécanisme d'action des sécrétagogues synthétiques de la ST a été élucidé depuis le clonage d'un récepteur hypophysaire orphelin appelé GHS-r1a ; cette qualification d'orphelin lui a été assignée puisque ce récepteur n'avait pas de ligand naturel connu, jusqu'à tout récemment. À la fin de l'année 1999, une publication clamait avoir trouver le ligand naturel du récepteur orphelin des ssST. L'isolement de ce ligand naturel serait un deuxième facteur sécrétagogue endogène de la ST. Publié en décembre par l'équipe japonaise de Kojima et coll. (58), la ghrelina (ghre est une racine proto-indo-européenne signifiant croissance (58) et de part le fait même «GH-rel...» est une forme abrégée de «Growth Hormone-releasing» (60) et le suffixe -ine signifiant «produit» (39) se soumet quelque peu à la nomenclature pour les hormones), s'est révélée être le ligand naturel du GHS-r. Ce nouveau peptide existe sous deux formes, soient la ghrelina(1-28) et la ghrelina Δ Q¹⁴(1-27), cette dernière présentant une glutamine en position 14 en moins. Ces deux formes auraient une même activité sécrétagogues sur la ST (50).

Les objectifs poursuivis lors de ce travail de recherche ont été d'isoler l'ADNc de la ghrelina porcine et d'explorer un dispositif d'administration pouvant augmenter la sécrétion de la ST de façon continue. En adoptant une approche empruntée à la thérapie génique, la transfection *in vivo* devait nous permettre d'administrer continuellement la

somatocrinine et la ghreline. L'aspect de transfection *in vivo* se limitera à l'utilisation de techniques déjà existantes et bien décrites.

Les connaissances issues des recherches sur les sécrétagogues de la ST pourront servir à plusieurs domaines d'applications cliniques pour le diagnostic de pathologie de sécrétion de la ST (45) ou pour des thérapies de remplacement dans les cas de retard de croissance associé à une déficience en facteurs hypothalamiques ou pour des troubles du sommeil, ou encore pour des désordres impliquant le contrôle de l'appétit (78, 104). Toutefois, notre priorité d'application se concentre vers un autre pôle, soit celui de la production animale, davantage que vers des intérêts biomédicaux humains.

2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

2.1. LES SÉCRÉTAGOGUES DE LA SOMATOTROPHINE (ST)

2.1.1. LA SOMATOCRININE (GRF)

Le facteur de relâche de la somatotrophine (ST) a été identifié en 1982 simultanément par l'équipe de Guillemin et coll. (42) et par l'équipe de Rivier et coll. (87). Ce peptide de 44 acides aminés nommé «Growth Hormone-Releasing Factor» ou GRF est sécrété par les noyaux arqués de l'hypothalamus, situés à la base du cerveau, dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (6, 54). Il est bien démontré que le GRF provoque spécifiquement la sécrétion de ST par l'hypophyse antérieure (32, 38), de même qu'il en stimule la synthèse en ARNm et en protéine (32).

La ST (99), la somatostatine (SS) (hormone inhibitrice de la sécrétion de ST) (31) et le GRF (99) sont tous sécrétés sous forme épisodique. L'association entre les pics et les vallées de ces épisodes de sécrétion a été étudiée chez le porc et aucune corrélation entre les concentrations de ces hormones n'a pu être faite, à l'exception d'une seule corrélation existant entre la baisse de concentration de SS dans le système porte hypothalamo-hypophysaire et une augmentation des concentrations maximales de ST sérique (27). Cette sécrétion épisodique a des importances physiologiques et rend la reproductibilité de ce système difficile.

Un supplément en ST exogène administré à un porc en croissance provoque des changements métaboliques remarquables qui se traduisent en des accroissements de

l'efficacité de la conversion alimentaire, de la rétention d'azote et du ratio muscle/gras de la composition corporelle.

Ainsi, étant donnée que le GRF induit une réponse en ST, l'utilisation de GRF aux mêmes fins anaboliques est possible. De plus, le GRF présente l'avantage d'être spécifique à la ST et d'induire un mode de sécrétion plus physiologique de cette dernière, c'est-à-dire une libération cyclique, par opposition à l'apport exogène en ST qui engendre un profil non physiologique de ST sous forme de concentrations élevés durant plusieurs heures. Quelques études ont démontré que les effets zootechniques du GRF étaient semblables à ceux de la ST (révisées dans 32). En particulier, l'étude réalisée par Dubreuil et coll. en 1990 (30), a démontré qu'un analogue du GRF ayant une demi-vie plus longue et administré trois fois par jour, amenait des changements des paramètres zootechniques similaires à ceux obtenus avec un supplément de somatotrophine porcine. Cette étude, de même qu'une autre réalisée par le même groupe (29), a démontré que les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure de porc ne se désensibilisent pas suite à une stimulation chronique à l'aide de GRF (1-29)-NH₂.

2.1.2. LES SÉCRÉTAGOGUES SYNTHÉTIQUES DE LA SOMATOTROPHINE (SSST)

Les sécrétagogues synthétiques de la ST (ssST) sont une gamme de composés initialement inventés par l'équipe de Bowers et coll. (7), lors de travaux sur les enképhalines et leurs analogues vers l'année 1976, soit avant la découverte du GRF en 1982 (42, 87). Les ssST ont été par la suite modifiés et conçus expressément pour leur activité sur la sécrétion de la ST. Certains de ces ssST sont actifs oralement et leur activité s'étend chez plusieurs espèces (13) dont le poisson («puffer fish») (93), le rat (9), les animaux de consommations

(9) tels que le poulet (37), le porc (24), le bovin (9) et ainsi que chez l'humain (10).

Le récepteur GHS-r1a est le récepteur liant les ssST. Il a été cloné, suite à des travaux ardu d'une équipe de Merck (51). Il est couplé à une protéine G - phospholipase C et est donc différent du récepteur du GRF, ce dernier utilisant une protéine G - adénylate cyclase. La distribution du GHS-r est vaste. Il s'est avéré présent dans l'hypophyse, l'hypothalamus et ailleurs dans le cortex cérébral ainsi qu'à plusieurs autres endroits dans l'organisme, particulièrement le myocarde. Plus précisément, dans l'hypothalamus, les récepteurs des ssST sont localisés dans le noyau arqué, le noyau ventromédian et le noyau paraventriculaire, soient des noyaux jouant un rôle d'importance dans l'homéostasie énergétique (92). L'activation du récepteur déclenche une dépolarisation membranaire et un blocage des canaux K^+ , engendrant une augmentation intracellulaire d'un second messager, l'inositol triphosphate (IP_3) et une augmentation transitoire du calcium intracellulaire. Cette augmentation en Ca^{++} intracellulaire fait relâcher les vésicules de ST vers le milieu extracellulaire (révisé dans 4). C'est ainsi que le récepteur GHS-r1a sert de médiateur de signaux entre les ssST et la ST.

Chez la souris, des ssST (Ipamorelin et GHRP-6) ont démontré une activité adipogénique ST-indépendant (62). L'activité adipogénique ST-indépendant a augmenté à court terme le poids d'amas d'adipocytes d'environ 65 % (62). Cette activité adipogénique est limitée aux deux premières semaines, correspondant à une augmentation de l'apport alimentaire de même qu'à une hausse sérique de leptine (62).

En production animale, quelques études sur les effets zootechniques des ssST ont été réalisées (révisé dans 13). Encore une fois, de par leur action sur la ST, ils engendrent

chez les animaux de consommation une sécrétion accrue de ST. De façon générale, les sécrétagogues synthétiques se sont démontrés capables d'induire une amélioration de la conversion alimentaire. Par contre, ils s'avèrent moins efficaces que des traitements à la ST seule et ces améliorations avaient tendance à s'estomper lorsque les traitements se prolongeaient. Ces effets d'atténuation sont traduits par une désensibilisation de la réponse de la ST aux ssST (révisé dans 13).

2.1.3. LA GHRELINE

Le récepteur GHS-r1a est orphelin, c'est-à-dire qu'aucun ligand endogène n'a pu être associé à ce récepteur. La disponibilité tissulaire du récepteur GHS-r1a est quasi-ubiquitaire et ce chez de nombreuses espèces. Ainsi, cela a laissé croire en l'existence d'un ligand naturel (51). Suite à des travaux réalisés sur des cellules arborant le récepteur pour les ssST (GHS-r1a), l'équipe de Kojima et coll. a réussi à isoler à partir d'extraits d'estomac de rat un peptide de 28 acides aminés capable de faire varier la concentration intracellulaire de calcium. Ce peptide, relativement abondant dans l'extrait d'estomac, présentait toutefois un poids moléculaire plus élevé que le poids moléculaire théorique de la séquence en acides aminés (58). La «ghreléline», ainsi appelée de sa racine proto-indo-européenne «ghre»

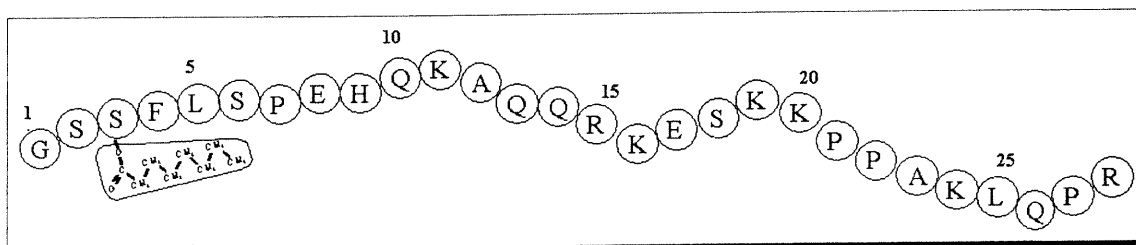


figure 1 : Représentation de la ghreléline de rat. À noter : l'acylation d'un acide octanoïque se fait sur la sérine en position 3 ; la région de la Gly¹ à la Pro⁷ est particulièrement très hydrophobe et rigide : la chaîne hydrophobe de l'octanoyle est rigide et entourée par deux acides aminés en positions 4 et 5, les phénylalanine et leucine dont les chaînes latérales sont hydrophobes, et le lien ester de l'octanoyle est stabilisé par la sérine en position 2.

signifiant «croissance» (58, 60), s'est vue afficher, suite aux analyses de spectrophotométrie de masse, une modification post-traductionnelle sur la sérine en position 3 (Ser³) sous forme d'acide gras à huit carbones (figure 1, page 7). L'acide octanoïque retrouvée sur cette Ser³ explique la masse moléculaire plus élevée que celle calculée théoriquement. Cet acide gras confère à ce peptide, retrouvé chez le rat et l'humain, une activité de relâche de la ST par l'entremise du GHS-r1a (58).

Deux formes de la ghrelina ont été décrites : la ghrelina(1-28) et la ghrelina Δ Q¹⁴(1-27), la seconde forme présentant une omission de la glutamine en position 14. Il est expliqué que les deux formes seraient transcrites à partir d'un seul et unique gène (50). Ce dimorphisme de la ghrelina est interprété par le fait qu'il existe un intron de 536 paires de bases, entre les codons 13 et 14, qui se termine par les acides nucléiques CAG CAG. L'épissage alternatif utiliserait alors l'un ou l'autre des dinucléotides AG pour reprendre le cadre de lecture, donnant naissance à la ghrelina(1-28) si le premier est préféré et à la ghrelina Δ Q¹⁴(1-27) si le second est utilisé. Le premier AG semblerait être préféré puisque que la concentration de la ghrelina(1-28) est environ quatre fois plus élevée que celle de la ghrelina Δ Q¹⁴ (50). Aucune différence d'activité entre les formes a été noté (50).

La ghrelina a été parallèlement et simultanément découverte par deux équipes de recherche : d'un côté, par l'équipe japonaise qui s'acharne sur l'élucidation des récepteurs à protéines G orphelins et de l'autre côté, par les efforts d'une équipe française, qui vise à identifier toute variation de l'expression de gènes le long du tractus gastro-intestinal. En procédant par criblage de clones d'une génothèque complémentaire d'estomac de souris, l'équipe française de Tomasetto et coll. (102) ont dès lors soumis une séquence d'un peptide

exclusivement exprimé dans l'estomac, qu'ils ont nommé arbitrairement m46, ce, au lendemain du 30 juin 1999, soit la date du dépôt des séquences des ADNc de la ghreline de rat et humaine par l'équipe de Kojima et coll. (58). Cette séquence, qu'ils allaient nommer plus tard «motilin-related peptide» ou MTLRP, s'est avéré homologue à celle de la ghreline de rat.

Les deux approches très différentes de ces deux équipes ont fait en sorte que Kojima et coll. ont parfaitement décrit ce peptide avec la particularité associée à sa fonction qu'est l'octanoylation en Ser³ (22). Leur technique de criblage de ligand pour un récepteur orphelin, a ainsi dépassé l'approche génétique de l'équipe française. Ainsi, il est à retenir que la littérature peut équitablement parlé de la MTLRP ou de la ghreline puisque les deux ont été découvertes simultanément tout en étant décrites différemment.

L'acylation en Ser³ de la ghreline est absolument nécessaire pour son activité de sécrétagogue de la ST, à la fois démontrée *in vitro* (4, 58) et *in vivo* (2, 81, 82, 91). L'ajout de cet acide gras lui donne un aspect très hydrophobe, une caractéristique qui est en accord avec les premiers acides aminés. Un tel attribut hydrophobe pourrait favoriser son passage au travers de la barrière hémato-encéphalique pour atteindre les récepteurs localisés dans le cerveau (12). Aussi, une telle acylation d'une sérine produite de façon biochimique et naturelle n'aurait été documentée que par Bednarek et coll. (4, 23, 58) qui font part de travaux mentionnant la détection occasionnelle d'acétylation de sérine (80) ou de conjugaisons avec des acides myristiques (14C) ou palmitique (16C) (86). La structure minimale pour l'activité de la ghreline dépend justement de cette *n*-octanoylation où la longueur de la chaîne acyle doit être au minimum de huit carbones (4, 59), pouvant aller jusqu'à 16 carbones (4) et doit être dépourvue de groupement hydrophile (4). Puisque cette

modification est autant essentielle à sa fonctionnalité, il est avancé que l'enzyme catalysant cette modification risque d'être une étape importante dans la synthèse et la régulation de la ghreline (60). Des analyses biochimiques plus poussées révèlent qu'un lien ester ou amide peut lier l'acide octanoïque à la Ser³ ou Ser² sans gêner sa fonction, mais les peptides acylés en Ser⁶ et Ser¹⁸ sont dépourvus d'activité sécrétagogue (4). Ceci suggère que les acides aminés à proximité de la Ser³ dirigent ou orientent son *n*-octanoylation (4). Toutefois, les peptides de la ghreline tronquée, comme la ghreline(1-4), témoignent d'une affinité diminuée (200x, comparativement à la ghreline(1-28)) pour le GHS-r1a, laissant croire que la partie C' terminale de la ghreline est tout de même nécessaire à l'interaction ligand-récepteur (4). Une étude encore plus intensive a démontré que les deux acides aminés Gly¹-Ser² agissent comme espacement entre la charge positive absolument nécessaire de l'amine en N' terminal et la chaîne hydrophobe en Ser³ (strictement en position 3) en plus de l'importance de charges positives (ou basiques) en C' terminal (72). Dans cette dernière étude par Matsumoto et coll. (72), ils ont même poussé les analyses (tortueuses mais très détaillées) afin de définir les caractéristiques nécessaires à la ghreline pour qu'elle ait une homologie de structure avec les ssST, puisque que la ghreline naturelle n'a pas de relation de conformation homologue envers les ssST (60).

En effet, de par sa liaison avec le récepteur des ssST, la ghreline entraîne une activation des cellules somatotropes. Cette action somatotrope est spécifique *in vitro* et *in vivo* chez le rat anesthésié (58). Cependant, des études démontrent que la ghreline n'est pas aussi spécifique qu'escompté. Le premier groupe d'études démontre que la ghreline administrée par voie intraveineuse (i.v.) à plus de 1 µg/kg chez l'humain est non seulement somatotrope mais aussi lactotrope et corticotrope (engendrant par la suite une stimulation

de libération de cortisol et d'aldostérone) (2, 82, 98), mais n'affecte en aucun temps les niveaux de FSH, LH et TSH (98). Le deuxième groupe d'étude avec des rats conscients (dose de hGhreline de 1 à 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) démontre les mêmes effets lactotrope et corticotrope (101). Ces stimulations lactotrope et corticotrope rencontrées dans les deux études sont toutefois légères, situées à des niveaux physiologiques normaux et ne sont aucunement comparables aux stimulations supra physiologiques de ST provoquées par l'injection d'un bolus de ghreline. Ainsi, il est alors important de noter la différence de spécificité de la ghreline : la ghreline fait libérer spécifiquement la ST lorsqu'administrée sous anesthésie au pentobarbital chez le rat, tandis que chez l'humain et le rat éveillé, la ghreline induit également une sécrétion de prolactine et d'adrénocorticotropine (ACTH). Ainsi, la différence de spécificité peut venir de (a) l'effet du pentobarbital qui est reconnu pour inhiber la relâche de somatostatine et de plusieurs autres facteurs hypothalamiques (91) et de (b) la dose de ghreline qui provoque proportionnellement les activités lactotropes et corticotropes à partir d'une dose plancher qui s'avère en soit assez élevée ($>1 \mu\text{g}/\text{kg}$) (98).

À la fois chez l'humain (2) et le rat (58, 91), il a été démontré que la ghreline détenait une capacité de sécrétion sur la ST supérieure à celle du GRF. Cette différence de capacité de sécrétion serait attribuable aux voies alternatives de stimulations des cellules somatotropes selon des effets propres aux sécrétagogues sur leurs récepteurs. Mais, d'un autre côté, un apport continu de ghreline par voie intracérébrovasculaire chez le rat provoque une diminution de la réponse en ST après environ une semaine ainsi qu'une diminution de la synthèse en ARNm de la ST (19). Cet effet a précédemment été démontré avec les ssST (8). Même en ayant une activité sécrétagogue plus élevée sur la ST, l'activité de la ghreline reposerait sur une collaboration avec le GRF. Cette collaboration serait

nécessaire à l'activité de la ghreline sur la sécrétion de ST (19). En fait, le GRF permettrait une synthèse de ST (91) et serait une substance clef dans l'amplification des niveaux de ST mais ne serait pas responsable de la génération et de l'apparition du profil pulsatile de la ST (90). Cette observation va de pair avec les corrélations établies par Drisko et coll. (27) comme quoi les concentrations de GRF du système porte hypothalamo-hypophysaire ne seraient pas corrélées avec les pics de ST systémique. La ghreline ne serait pas non plus la responsable de ce profil pulsatif (90), mais c'est plutôt la somatostatine qui serait l'hormone chef responsable du relâchement cyclique de la ST.

Tout récemment, un neuropeptide naturel, la cortistatine-14 (CST), initialement isolé en 1996 (21) et partageant une homologie de structure avec la somatostatine (11 des 14 acides aminés sont identiques), a été en mesure de déplacer l'hexareline (un ssST) ainsi que la ghreline de leur liaison spécifique avec le récepteur GHS-r (20, 77). Ce peptide se présenterait comme étant l'antagoniste naturel de la ghreline. La CST apparaît selon un rythme circadien (96), mais rien encore n'a été démontré sur une quelconque activité de la CST sur le GHS-r.

L'attrait principal de la ghreline est sa caractéristique somatotrope, mais la ghreline ne se limiterait pas uniquement à cette fonction. Étant donné sa nouveauté, il est intéressant de parcourir davantage les ouvrages arborant les récentes notions qui entourent la ghreline. Ces nouvelles notions sont désormais plus étendues que celles bordant la ST. Plusieurs notions proviennent déjà des études faites sur les ssST. Mais les recherches menées présentement sur la ghreline portent davantage sur sa synthèse et sur les cellules qui l'exercent, sa distribution, sa régulation et ses interactions dans l'univers du métabolisme, non seulement entourant la somatotrophine, mais aussi impliquant le système digestif. Par

conséquent, des analyses immunohistochimiques ont confirmé que la ghrelina se retrouve dans les cellules endocriniennes du tube digestif (102) de type X/A («X/A-like cells») au niveau de la sous-muqueuse de l'estomac, dans le duodénum, le jéjunum, l'iléum et le cæcum (18, 49, 102). L'équipe française de Tomasetto et coll. précise et confirme que des granules de sécrétion de la m46 ou MTLRP (ghrelina) se dirigeaient vers la circulation et que le contenu stomacal n'en contenait pas (102). D'un autre côté, le récepteur des ssST se retrouve principalement, en ordre décroissant, dans le myocarde, les glandes surrénales, les testicules, le poumon, les ovaires, le foie, les muscles squelettiques, les reins et est relativement absent du système digestif (81). Le grand nombre de ces récepteurs au coeur semble vouloir inférer sur l'implication de la ghrelina dans des effets cardio-vasculaires quelconques (60).

Plusieurs peptides gastro-intestinaux comme la gastrine, la motiline et la somatostatine sont impliquées dans la régulation des fonctions gastriques et intestinales. De part la forte expression de la ghrelina dans l'estomac, des études ont tenté de soulever quelconques rôles de cette dernière dans l'appareil gastro-intestinal. Ainsi, à la suite d'une injection i.v. de ghrelina chez le rat, il se produit au niveau de l'estomac une augmentation, à la fois en amplitude et en fréquence, de façon dose-dépendante, de la motilité, de même que de la sécrétion en acide chlorhydrique (70). Étant donné la faible présence de récepteurs des ssST dans le système digestif (81), il est suggéré (démontré par une vagotomie) que ces stimulations se produisent par l'entremise d'une activation parasympathique du nerf vague par la ghrelina (70). Toutefois, aucun indice démontre que cette activation est provoquée directement ou indirectement.

Chez des rongeurs, des études suggèrent que la ghreline joue un rôle dans l'augmentation de l'apport alimentaire (3, 62, 78, 92, 110), et ce, proportionnellement à la dose injectée (92). À l'inverse de la leptine, la ghreline provoque chez le rat une augmentation de l'expression de neuropeptide Y (NPY) (3, 92), un peptide hypothalamique agissant sur la perception de la faim. L'apport alimentaire induit par la ghreline dépend de la présence de ce NPY, tel que démontré chez des souris déficientes du gène du NPY traitées avec un supplément de ghreline (104). Malgré que cet effet orexigénique de la ghreline soit indépendant de la ST (92), la ghreline apporte quand même l'élément manquant dans la boucle entre le système digestif, le cerveau et le métabolisme ou, en fait, plus précisément entre l'estomac et le centre nerveux d'homéostasie énergétique, l'axe hypothalamo-hypophysaire. En effet, l'étude de Tschöp et coll. réalisée chez la souris et le rat fait mention d'une augmentation du quotient respiratoire sans changement dans les dépenses énergétiques, indiquant alors une utilisation plus grande des hydrates de carbones et que ces effets étaient indépendants des concentrations de ST (104). Pour en arriver à ces conclusions, ils ont comparé les effets de la ST et de la ghreline parallèlement pour démontrer une action de la ghreline stimulée par la ST. Toutefois, cette étude n'a pas démontré que le pouvoir sécrétagogue de la ghreline sur la ST pouvait être équivalent à la ST en injection bolus et, de plus, la possibilité n'est pas exclue que la ghreline gastrique et la ghreline hypothalamique aient toutes deux des activités et des rôles différents. Malgré tout, en comparant cette étude avec l'étude de Lall et coll. (62) réalisée avec les ssST chez la souris, on peut conclure que le métabolisme glucidique serait orienté vers la lipogénèse. De plus, selon l'équipe de Tschöp et coll. (104), les concentrations de ghreline sérique seraient à des niveaux élevés en état de jeûne et que le gavage avec de l'eau ne changerait

rien aux niveaux sériques de ghreline mais que le gavage avec de l'eau dextrosée ferait diminuer en 15 minutes de moitié les niveaux de ghreline sérique.

Cette même équipe a observé que la stabilité moléculaire de la ghreline serait proche de celle de la somatocrinine, i.e. la demi-vie de la ghreline serait courte et estimée de 15 à 30 minutes au plus (12, 104). Cependant, un ou des systèmes permettant la liaison (protéine de liaison) ou la destruction / inactivation spécifique de la ghreline dans des conditions particulières ne sont pas connus et ils pourraient venir fausser cette estimation. Une courte demi-vie en association avec un site de synthèse principal (l'estomac) qui se retrouve distant de l'hypophyse, expliqueraient pourquoi autant d'années se sont écoulées pour la réalisation de l'isolement et la caractérisation fructueuse de ce peptide particulier. Comme pour plusieurs autres peptides, on retrouve une double activité et un double site de synthèse de la ghreline, (elle affecte la ST et l'apport alimentaire et elle est synthétisée principalement dans l'estomac et aussi dans le noyau arqué de l'hypothalamus) faisant en sorte qu'une interdépendance entre les activités et les sites d'origine devrait éventuellement être établie plus précisément (12).

Les différences attribuables au sexe et à l'âge pour l'expression de la ghreline gastrique chez le rat seraient négligeables (41). Il est avancé que la source du dimorphisme sexuel sur le profil de sécrétion de ST (plus élevé chez les mâles) ne serait pas lié à la ghreline (41).

La ghreline est aussi une hormone impliquée dans la gestation (40). Il a été démontré que la ghreline n'est pas présente dans le placenta en début de gestation, mais qu'elle augmente graduellement pour atteindre un pic à la mi-gestation pour devenir non détectable à terme et ce chez le rat et l'humain. La ghreline a été localisée par immunohistochimie

principalement dans les cellules cytotrophoblastiques davantage que dans les cellules syncytiotrophoblastiques de placenta humain lors du premier trimestre de la grossesse. Par la suite, chez le rat, l'expression de l'hormone gastrique est à son plus bas à la naissance, augmente avec l'âge et se stabilise vers 40 jours d'âge, tel que démontré par la quantité d'ARNm de la ghreline gastrique chez le rat âgé de 9, 21, 40, 60 et 90 jours (41).

2.2. EFFET SYNERGIQUE DE LA GHRELIN ET DE LA SOMATOCRININE SUR LA LIBÉRATION DE ST

Puisque maintenant trois hormones sont connues pour agir comme stimulateurs ou inhibiteur de la fonction somatotrope, soient le GRF, la ghreline et la SS, les portes s'ouvrent davantage à des expérimentations plus poussées visant une meilleure compréhension de l'interaction de ces peptides sur la régulation de la sécrétion de ST. La relation et l'interaction entre la ghreline et le GRF sont plus particulièrement attrayantes, de par leur capacité à stimuler la ST de façons distinctes.

Les premières études corrélant les effets combinés du GRF et des ssST sur les niveaux circulants de ST ont été publiées en 1989 et 1990. Cheng et coll. (14) ont démontré une synergie entre les deux sécrétagogues GRF et GHRP-6 (un ssST) sur un modèle de cellules hypophysaires de rat. Ils ont pu démontrer que les deux sécrétagogues agissaient via deux mécanismes d'action différents et indépendants (discutés à la page 6). Au même moment, Bowers et coll. démontraient *in vivo* cette synergie entre le GRF et le GHRP-6 chez l'humain, le rat, le singe rhésus et le bovin (10). Leur méthodologie n'a rendu significative la démonstration de cette synergie sur la ST qu'à des doses de GRF de 1 µg/kg

et de GHRP-6 de 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Par contre, à plus fortes doses de GHRP-6, la synergie semble présente chez chacun des individus, mais ne mène pas à des résultats significatifs. En fait, cela pourrait dépendre des rapports de dose entre le GRF et le ssST, qui varient à tout moment. Mais l'utilisation des ssST dans cette relation avec le GRF n'a pas reçue autant d'engouement qu'escompté étant donné que les mécanismes d'action et d'interaction ont demeuré incompris, jusqu'à la découverte du GHS-r et de la ghreline.

Une première étude de synergie où on a utilisé conjointement le GRF et la ghreline appuie largement la thèse de synergie entre ces peptides (2). Chez l'humain, les taux de ST dans les 60 minutes suivant l'injection (ST sérique $\sim 3400 \mu\text{g}/\text{L}/\text{h}$) des deux peptides (à 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ chacun) sont plus grands que la somme de chacune des réponses seules (ghreline seule : $\sim 2000 \mu\text{g}/\text{L}/\text{h}$ et GRF seul : $\sim 600 \mu\text{g}/\text{L}/\text{h}$).

D'après les résultats obtenus avec l'étude de Tschöp et coll. (104) (décrite à la page 14), montrant une augmentation de l'apport alimentaire en plus d'une lipogénèse ciblée et un anabolisme augmenté sous l'effet de la ghreline serait indépendant de la ST, d'où l'intérêt de considérer la combinaison de la ghreline et du GRF. Cette combinaison favoriserait une croissance accrue et plus physiologique, puisque la ghreline et la ST utiliseraient des voies métaboliques différentes, mais sans doute complémentaires l'une à l'autre. Aussi, avec une telle combinaison ghreline + GRF, les concentrations sériques désirées en ST pour atteindre l'effet recherché sur la croissance n'exigerait pas autant de ghreline ou de GRF en combinaison que ne le demanderait l'un de ces sécrétagogues seul. Puisque la sécrétion de ST serait stimulée de façon synergique à la fois par la ghreline et le GRF à des doses inférieures, les effets non désirés (soient une augmentation de cortisol et de prolactine) obtenus suite à une haute dose de ghreline ne seraient pas présents ou du

moins ils pourraient être diminués. Toutefois, l'avantage anticipé d'une croissance accrue et de manière «plus physiologique» par la ghreline, d'après l'étude de Tschöp et coll. (104), n'a été réalisé que chez des rongeurs, chez qui le métabolisme de la ST est différent de celui de l'humain ou du porc.

2.3. TRANSFECTION *IN VIVO*

La thérapie génique est une avenue prometteuse pour le traitement de maladie d'origine congénitale chez l'humain, comme la dystrophie musculaire ou la fibrose kystique, ou pour d'autres applications thérapeutiques comme la vaccination. L'idée est venue initialement, au cours des années 1960 (109), avec la possibilité de priver des virus, tel que des adénovirus, des rétrovirus, des virus influenza ou parainfluenza, de toutes fonctions virulentes, afin de les rendre partenaires dans la correction de malformations génétiques. Ces virus atténués sont modifiés de sorte qu'ils peuvent transporter des séquences codantes pour une protéine d'intérêt tout en ayant perdu leurs activités de réplication. Ensuite, ils sont introduits chez un hôte où ils infectent des cellules cibles. Dans ces cellules cibles, habituellement somatiques, mais il est possible qu'elles soient germinales, ils y produisent la protéine d'intérêt comme si elle faisait partie intégrante du génome viral. Ainsi, une protéine d'intérêt peut remplacer une protéine qui est absente ou défectueuse ou encore agir sur une autre protéine qui est sur-exprimée ou potentiellement dangereuse, pour en fait réussir à obtenir une réponse biologique désirée. Mais les risques d'inversion des atténuations virales et la présence de particules virales dans les préparations pharmaco-industrielles sont toujours et demeureront toujours des éventualités dans l'application de ces virus apprivoisés à des fins thérapeutiques.

D'un autre côté, l'explosion de la biologie moléculaire dans les années 70 et 80 a rendu facile l'accessibilité à des molécules d'ADN stables, nommées plasmides, couramment utilisés à des tâches quotidiennes en laboratoire. La transformation *in vitro* de cellules procaryotes et de cellules eucaryotes, menant à l'expression de gènes de résistance, de gènes indicateurs ou d'autres gènes d'intérêts introduits dans les plasmides, est devenu un outil commun dans les sciences de la vie. Puisque ces molécules d'ADN sont dépourvues de toute capacité de réplication et d'infection, leur usage pour les transfections *in vivo* s'est montré plus avantageux face aux virus atténués.

Le premier compte rendu de cellules eucaryotes transformées *in vivo* avec de l'ADN nu a été rapporté en 1990 par Wolff *et coll.* (108). À peu près au même moment, le premier essai clinique chez l'humain avec un vecteur rétroviral a été réalisé par l'équipe de Blaese *et coll.* (5). Les premiers ont publié que l'acétyl CoA transférase était exprimée par le muscle pendant plus de deux mois (108) après une simple injection intramusculaire d'ADN nu chez la souris. Malgré une décennie de recherche, l'efficacité de transfection *in vivo* laisse toujours à désirer ; les niveaux d'expression sont bas et variables et l'application de la thérapie à un tissu cible ou à une localisation déterminée pour une incorporation définitive est limitée puisque l'expression ne se maintient pas très longtemps. Cette dernière particularité peut en fait être un avantage discutable, puisqu'en production animale, cela implique que l'expression et potentiellement le transgène disparaît par lui-même dans un laps de temps pouvant être quantifié. Malgré tout, face à ces difficultés, plusieurs alternatives ont été trouvées et adaptées. Ainsi, des systèmes de livraison, ou encore des dispositifs d'administration de l'ADN permettant une incorporation vers le noyau des cellules, se sont développés de façon continue.

Un des dispositifs d'administration consiste en des lipides amphipathiques, de charges cationiques (simples ou multiples) à une extrémité et de propriétés hydrophobes à l'autre. Ces lipides ont la caractéristique de pouvoir former un amas autour de l'ADN plasmidique, pouvant ainsi promouvoir la fusion du génosome (ADN + liposome) avec la membrane plasmique de la cellule. D'autres rôles de ces lipides synthétiques sont de condenser l'ADN et de le protéger des nucléases et des attaques du système immunitaire. Ces lipides semblent toutefois jouer le rôle d'agent de rétention pour l'ADN afin de lui permettre de gagner la cellule (95). L'étape limitative reste encore le transport de l'ADN exogène vers le noyau, car ce dernier est le seul lieu de transcription de l'ADN. Puisque la barrière que constitue l'enveloppe nucléaire est relativement et sélectivement imperméable, la seule opportunité que détient l'ADN pour y pénétrer se présente lors de la division cellulaire où la membrane nucléaire se retrouve disloquée. Ainsi, la transfection exige qu'elle soit ciblée à des tissus en multiplication cellulaire, i.e. en croissance ou en régénération.

L'électroporation est une autre méthode utilisée. Elle favorise la déstabilisation de la membrane plasmique par l'ouverture ou la dilatation des pores, permettant le déplacement et le transfert de molécules chargées vers l'intérieur de la cellule et du noyau. Cette technique est couramment utilisée en laboratoire sur des cellules de tous types dans des conditions *in vitro* et davantage utilisée pour la création de végétaux (47) et d'animaux transgéniques^a. Elle est aussi utilisée *in vivo*, entre autre chez des patients humains, pour livrer des molécules pharmacologiques de petites tailles à un site précis (46, 108). L'idée est venue en 1991 (100), de pratiquer une transfection *in vivo* par électroporation, mais cette

^a Smith L C (mai 2000), communication personnelle.

fois-ci, toujours à l'aide d'une molécule chargée, soit l'ADN nu. Des expressions de l'ordre ~100 (75) à ~10 000 (105) fois plus élevée, de la luciférase par électrotransfert génique, comparativement à une transfection musculaire d'ADN nu ont été obtenus pour une période de plus de 270 jours chez la souris (74). Plusieurs résultats semblables ont été rapportés chez la souris, le rat et le lapin, avec d'autres gènes indicateurs dont la plupart étaient sous l'expression du promoteur CMV, comme la luciférase (46, 74, 75, 106) ou encore β -gal (1, 71, 75), ou avec des gènes d'importance médicale tels que l'érythropoïétine chez la souris (88) et le rat (69, 89) ou l'interleukine-5 (1), démontrant ainsi que le transfert génique par électroporation ou GET est une méthode peu envahissante et efficace pour le transfert de matériel génétique de molécules synthétiques.

Plusieurs équipes ont travaillé sur la mise au point de techniques et de paramètres d'électrotransfert génique *in vivo* chez des modèles murins et de rat en utilisant des gènes indicateurs tels que la luciférase ou le β -gal (1, 46, 71, 74, 75, 106). Dans la majorité de ces travaux, les paramètres d'électroporation qui suivent ont été étudiés de façon plus détaillée : la durée des pulsations, le nombre de pulsations et l'intervalle de temps les séparant, la polarité des pulsations et le taux de la différence de potentiel (voltage/distance), de même que d'autres paramètres de thérapie génique influençant la technique, soient : la quantité d'ADN injecté par rapport au poids de l'animal, le site d'injection et d'électroporation, la concentration d'ADN et le type de tampon(44).

Pour en arriver à une expression optimale suite à une GET, un certain consensus semble s'établir (1, 26, 46, 69, 71, 74, 75, 88, 89, 106, 107) et peut se résumer comme suit : lorsque la différence de potentiel augmente sur une distance donnée, le nombre de pulsations et la durée de chacune des pulsations doivent diminuer et l'inverse est vrai,

démontrant qu'il soit nécessaire de conserver une constante. Il est toutefois nécessaire d'utiliser un appareillage qui permet la livraison d'une décharge électrique à très basse intensité (<50 mA) et qui a la particularité de procurer une différence de potentiel selon une «onde carrée», c'est-à-dire que le voltage passe de 0 au voltage désiré de façon instantanée et qu'il retourne à 0 aussi rapidement. De façon générale, les conditions les plus fréquemment utilisées sont de l'ordre de 100 à 400 Volts/cm, à des pulsation de 1 à 2 Hertz d'une durée de moins de 50 millisecondes répétées entre 3 et 32 fois, toutes orientations confondues.

Les quantités d'ADN injectées et le type de tampon influencent l'efficacité d'expression de la transfection. Les quantités d'ADN plasmidique administrées pour électroporation sont de l'ordre de 1 à 50 µg à des concentrations de 0,02 à 1,5 µg/µL par souris (de 15 à ~25 g) (1, 75, 88, 89, 106, 107), de 1 à 4 x 100 µg à des concentrations de 0,02 à 1,0 µg/µL pour le rat (de 100 à 250 g) (46, 69, 71, 89) et de 10 mg à une concentration de 2 mg/mL pour des porcelets de 5 kg (26). Ainsi, les ratios ADN : poids de l'animal varient de 0,04 à 3,33 mg/kg pour la souris, de 0,004 à 4,0 mg/kg pour le rat et est de 2 mg/kg pour le porc. Le type de tampon choisi pour livrer l'ADN est habituellement de la saline (0,9%) ou du PBS (pH7,4) et parfois du Tris-EDTA. Toutefois, une publication (44) a décrit l'influence de la solution de livraison : les sels de sodium sont meilleurs que d'autres sels (potassique, de magnésium, de calcium, de zinc ou de fer) et ces sels de sodium sont préférablement du phosphate ou de l'acétate. Le site d'injection diverge aussi d'un auteur à l'autre : le muscle *tibialis cranialis* est le plus fréquemment choisi (1, 71, 75, 107), suivit des muscles de la cuisse (*quadriceps femoris* (69, 88, 89) ; semi-tendineux (26)) et d'autres tissus (foie (46) ; glande mammaire (106)).

D'autres techniques de transfection *in vivo* ont été développées afin de cibler la transfection à un tissu ou une localisation déterminée. Entre autre, il est possible de cibler le foie et cela est réalisable avec une technique qui exploite un principe hydrodynamique. La méthodologie est simple : on procède à une injection par la veine de la queue, chez la souris, d'un volume important (environ 10% de sa masse corporelle) qui vise à congestionner de façon transitoire le coeur en dépassant son débit de sortie pour provoquer un reflux via les veines hépatiques (67, 112). Cette approche, utilisant des gènes indicateurs comme l' α 1-antitrypsine humaine (hAAT), β -gal ou luciférase avec le promoteur du CMV, a démontré que l'expression atteignait son maximum en moins de 48 heures, diminuait pour une période d'environ un mois et demeurait stable pour plus de six mois (112). De plus, le foie consiste en une cible de choix étant donné sa capacité et sa grande diversité de synthèse de protéines. Toutefois, cette technique est concrètement irréalisable pour une application à des modèles animaux plus grands que la souris à cause du volume d'injection nécessaire au principe hydrodynamique.

D'autres méthodes pour cibler la transfection ont été tentées ; l'une d'elle est pratiquée par l'utilisation d'ultrason (52, 64). Le principe d'application de l'ultrason repose hypothétiquement sur l'agitation des membranes lorsqu'il est correctement convergé. Il est aussi avancé que l'ultrason stimule la division cellulaire, hypothétiquement à cause de dommages induit au niveau des tissus. Il s'en suivrait une régénération cellulaire qui favoriserait l'entrée de l'ADN exogène dans le noyau lors de division cellulaire.

Également, une autre approche, la «géo-balistique», utilise un fusil déchargeant un gaz sous pression qui sert à propulser des micro-particules transportant l'ADN à travers les membranes plasmidique et nucléaire des cellules (61). Ainsi, les tissus ciblés,

habituellement l'épiderme, mais aussi d'autres tissus exposés chirurgicalement comme par exemple le foie (61), peuvent être transfectés efficacement par cette méthode microbalistique.

Autrement, il est possible de cibler des tissus à l'aide de ligand spécifique. Ces ligands peuvent être attachés directement à l'ADN ou de façon indirecte au liposome. Des ligands spécifiques à un récepteur favorisent l'incorporation de l'ADN dans des cellules cibles arborant le récepteur désiré (35). Également, on peut favoriser l'incorporation de l'ADN dans le noyau avec un polypeptide ; par exemple, la protéine nommée NLS («nuclear localisation signal») peut être attachée sur des lipides amphipathiques et peut diriger le «phagoliposome» vers le compartiment nucléaire.

Il demeure que la transfection *in vivo* présente des avantages notables en comparaison à la transgénèse. La thérapie génique par opposition à la transgénèse se définit plutôt comme étant une modification post-conception ou post-natale, pouvant être non permanente, limitée aux individus recevant le traitement et est non transmissible, pour autant que la transfection soit produite sur des cellules somatiques. De plus, dans plusieurs essais en transgénèse sur l'amélioration de la croissance, un bon nombre d'animaux transgéniquement modifiés en regard aux protéines ST et IGF-1 étaient mort-nés, n'arrivaient pas à terme, souffraient de malformation au cours de leur croissance ou encore, demeuraient infertiles (16, 84). Même si ces animaux transgéniques avaient leurs gènes sous un contrôle inductif, les mêmes problèmes de croissance survenaient (85).

De son côté, la transfection *in vivo* présente l'avantage de favoriser une modification génétique planifiée et transitoire. Idéalement, la thérapie génique vise à devenir l'outil de la régulation de transgènes sur commande ; elle devra présenter des propriétés à s'activer

promptement, à se moduler facilement avec précision et à devenir complètement silencieux au besoin (15). Soit disant, cette transgénèse à «rhéostat» doit faire face à bien des développements et des mises au point avant d'acquiescer cette qualité de rhéostat. Pour parvenir à de telles régulations, la thérapie génique demandera beaucoup de recherche sur les promoteurs (1, 65, 111), sur le transport de l'ADN vers le noyau et sur le ciblage tissulaire ou cellulaire de la transfection. Étrangement, la thérapie génique basée sur un mécanisme non viral tente de faire évoluer ses molécules d'ADN inertes vers ce en quoi les virus sont en réalité. Pourtant, les virus y ont mis des âges afin de confectionner leurs fonctions, désormais convoitées. Néanmoins, les études portant sur les essais de transfection *in vivo* ou en thérapie génique sont nombreuses mais peu avancées.

La première documentation sur l'utilisation du gène du GRF à l'intérieur d'un système de transfection a été publié en 1992-1993 par Mehigh et coll. (73). Ils ont réalisé la transfection de cellules bovines avec un vecteur rétroviral dérivé du virus de la leucémie bovine («Bovine Leukemia Virus», BLV). Toutefois, leur système requérait l'utilisation d'un virus «helper» chargé de faire la traduction réverse du rétrovirus, ainsi, il devenait lourd et dangereux de l'utiliser *in vivo* et ils n'ont pas donné suite à leurs travaux. Cependant, en 1997, Draghia-Akli et coll. (25) a démontré des effets positifs sur la croissance chez des souris suite à une transfection *in vivo* avec l'ADNc du GRF(1-44) humain. Ce même groupe de chercheurs a amélioré leur vecteur plasmidique avec un promoteur spécifique aux cellules musculaires dérivé de l' α -actin squelettique de poulet (111). Durant nos premiers balbutiements dans les travaux en transfection *in vivo*, en décembre 1999, cette même équipe a publié l'application de leur système chez le porc et ils ont réussi à démontrer des résultats significatifs avec des groupes composés de seulement

deux animaux par groupe (26). Ils avaient utilisé l'électroporation comme méthode de transfert de gène plasmidique (10 mg) dans le muscle *tibialis cranialis* chez le porcelet de 5 kg. Depuis ce temps, aucune autre publication sur le sujet de ce groupe n'a été notée, indiquant peut-être des difficultés de développement. C'est cette approche d'électroporation que nous avons tenté de reproduire et d'établir pour cette étude.

2.4. HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Puisque des études montrant qu'un approvisionnement continu ou fréquent en ST ou en facteur de relâche (GRF) est nécessaire dans l'obtention d'effets zootechniques accrus et que cet apport continu d'une source exogène de peptides est laborieux, il importe de trouver un système de libération continue ou retardée pour ces peptides. C'est pourquoi la transfection *in vivo* s'avère un outil propice pour contrer ces difficultés. Étant donné que la transfection *in vivo* permet la production endogène et continue ou inductifs de peptides, l'intégration de ces peptides somatotropes, en particulier le GRF et la ghreline, dans un système de transfection *in vivo* s'avère d'un grand intérêt et tout un nouveau champ d'exploration.

Durant cette étude, nous avons voulu déterminer les paramètres de transfection *in vivo* à la fois pour le GRF et pour la ghreline. Nous voulions également étudier les effets singulier et combiné de ces facteurs de relâche de la ST. Pour y arriver, nous avons construit un vecteur détenant un promoteur d'expression eucaryote universelle, celui du cytomégalovirus (CMV), avec l'ADNc du GRF porcine. Les objectifs propres à cet ouvrage ont été (1) d'isoler l'ADNc de la ghreline porcine, (2) de composer un vecteur avec l'ADNc de la ghreline porcine et du promoteur CMV, (3) de faire l'utilisation des deux plasmides du GRF et de la ghreline en transfection *in vivo* pour (4) en mesurer l'augmentation du taux basal ou l'intensité des pics de ST et (5) de mesurer les effets de ces augmentations en ST sur le métabolisme général et sur la croissance.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

La section matériel et méthodes comprend plusieurs sections qui s'entrecroisent. Elle a été divisée selon un ordre logique de manipulations tout en tentant de conserver un ordre chronologique d'événements. Ainsi, les grandes lignes de la section matériel et méthodes se résument en cinq grandes sections qui se dérouleront comme suit :

1. Synthèse de pCMV contenant l'ADNc de la somatocrine porcine
2. Synthèse de pCMV contenant l'ADNc de la ghreline porcine
 - a. Isolement de l'ADNc de la ghreline porcine
 - b. Incorporation de l'ADNc de la ghreline porcine dans pCMV
 - c. Techniques de biologie moléculaire communes à plusieurs parties
3. Transfection avec les plasmides pCMV contenant les ADNc obtenus
 - a. *in vitro*
 - b. *in vivo*
 - i. Mode d'administration
 - ii. Dispositifs d'administration
 - iii. Manipulation des animaux
4. Analyses exercées suite aux transfections *in vitro* et *in vivo*
5. Analyses statistiques

3.1. ISOLEMENT DE L'ADNc DE LA SOMATOCRININE PORCINE ET INCORPORATION DANS pCMV

L'ADNc du GRF porcin a été isolé à partir d'extrait d'hypothalamus de porc et cloné dans le vecteur pCR3.1[®] (*Invitrogen*) contenant le promoteur CMV humain. Cette

construction plasmidique a été accomplie durant un autre projet, qui a précédé le projet menant à cette ouvrage. Une caractérisation complète a été accomplie dans notre laboratoire afin de s'assurer de l'authenticité du plasmide, c'est-à-dire des digestions par endonucléases de restrictions (décrit au paragraphe 3.2.3.10, page 42) avec EcoRI, NcoI, PstI et PvuII, mises sur gel (section 3.2.3.3, page 38) et un séquençage (section 3.2.3.5, page 39).

3.2. ISOLEMENT DE L'ADNc DE LA GHRELINÉ PORCINE ET INCORPORATION DANS pCMV

3.2.1. ISOLEMENT DE LA GHRELINÉ PORCINE

3.2.1.1. Récolte de tissus

Selon Kojima et coll. (58), la ghreliné est exprimée principalement dans l'estomac. Ainsi, afin de repêcher l'ADNc de la ghreliné porcine, un prélèvement d'une section d'estomac a été fait sur un porc à l'engraissement pesant 40 kg, en deçà de 5 minutes après le décès de l'animal. Huit morceaux d'allure cubique d'environ 0,25 cm de côtés ont été excisés de la partie pylorique de l'estomac du porc à jeun. Le prélèvement incluait une section complète de la paroi digestive, c'est-à-dire la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculéuse et la séreuse de l'estomac. Immédiatement, les morceaux gastriques ont été congelés dans de l'azote liquide et conservés dans des micro-tubes de polypropylène 1,5 mL à -70 °C.

3.2.1.2. Isolement de l'ARN total

L'ADNc est en fait une copie de l'ARNm. Ainsi, pour récupérer l'ARNm, l'ARN

total a été isolé. Donc, 300 mg de tissus d'estomac de porc ont été homogénéisés avec un Polytron® (PT1200, Kinematica AG, Suisse) dans 3,8 mL de tampon RLT (# cat 79216, Qiagen®), contenant 1,0 % β -mercaptoéthanol, cat # M6250, Sigma Chemical). Une fraction, soit 600 μ L de ce lysat, servit à isoler l'ARNtot sur colonne selon le protocole de la trousse RNeasy® mini kit (été-automne 2000, #cat 74104) de Qiagen®. L'ARNtot a été éluée avec 2 x 30 μ L d'eau fournie («RNase Free water», Qiagen®) pour ensuite être conservé à -70 °C. Une analyse visuelle rapide et non raffinée fut complétée sur gel d'agarose 1,0% teinté d'EtBr (section 3.2.3.3, page 38) pour en estimer la qualité et la quantité. De même, une lecture de l'absorbance (section 3.2.3.4, page 39) est venue compléter l'analyse de l'ARNtot.

3.2.1.3. Synthèse d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) par rétrotranscriptase (RT)

Une banque d'ADNc, ou génothèque complémentaire, a été construite à partir d'ARNtot d'estomac de porc (de la section 3.2.1.2) selon la méthodologie suivante : une incubation de 10 minutes à 65 °C de 2,0 à 4,0 μ g d'ARNtot d'estomac de porc et de 200 ng d'oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Canadian Life Technologies®) a précédé l'incubation de 60 minutes à 37 °C avec 1 μ L d'enzyme Sensiscript^{MC} RT (Qiagen®), 0,5mM dNTP (Qiagen®) dans le tampon fournie par Qiagen®. Cette banque d'ADNc fut conservée à -20 °C jusqu'à l'utilisation.

3.2.1.4. Amplification en chaîne par polymérase (ACP)

Les réactions d'amplification en chaîne par polymérase (ACP) ont été effectuées selon les paramètres suivants : 2,5 U/100 μ L d'ADN polymérase Taq (Canadian Life

Technologies[®]), 0,5 µM de chacune des amorces (définies ci-après) sens et antisens et 0,2 mM dNTP (Canadian Life Technologies[®]) dans le tampon PCR 1X (Canadian Life Technologies[®], tampon PCR stock 10X contient 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl) ajusté à 1,5 mM MgCl₂ (Canadian Life Technologies[®]) ; une dénaturation à 95 °C pendant 5 minutes a précédé les cycles de trois stades : un stade de dénaturation à 94 °C, un stade d'annelage^a dont la température est spécifique aux amorces et un stade d'élongation à 72 °C où les temps de stades variaient de 30 à 60 secondes selon les cas. Le nombre de cycles variait selon l'amplification. L'appareil servant à ces manipulations était le modèle Hybaid de OmniGene (HBTR3CM, Royaume-Uni).

Une analyse sur gel d'agarose a été réalisée après chaque amplification (section 3.2.3.3, page 38).

Précédant chaque utilisation des produits d'amplification, chaque produit d'ACP a été purifié sur colonne (section 3.2.3.1, page 37) ou prioritairement séparé et isolé sur gel d'agarose (section 3.2.3.3, page 38) et ensuite purifié sur colonne (section 3.2.3.2, page 38). Les fragments purifiés d'ADN sortant des amplifications devaient être clonés dans pGEM[®]-T Easy (section 3.2.3.6, page 40) et ensuite séquencés (section 3.2.3.5, page 39)

3.2.1.4.1. Synthèse d'amorces

Les amorces ont été synthétisées par Canadian Life Technologies[®] selon nos critères et spécifications. Nous avons utilisé le logiciel Oligo 4.0s pour la conception des amorces.

^a annelage n. m., domaine : biologie, (anglais : annealing), déf. : Hybridation d'un oligonucléotide synthétique à un acide nucléique simple brin. Note : C'est de cette façon que l'on repère une séquence nucléotidique spécifique. [1994]
www.granddictionnaire.com, consulté en date du 02 mai 2002

Le logiciel Internet CLUSTAL W (version 1.81)^a s'est avéré l'outil de référence, pour sa capacité d'alignement de séquence et pour les analyses d'homologie. La figure 2 décrit et illustre les séquences et les positions des amorces utilisées dans la méthodologie décrite ci-après.

3.2.1.4.2. 1^{ère} étape : ACP basée sur l'homologie humaine

Afin de repêcher une première partie de l'ADNc de la ghreline porcine, les amorces sens 5'-GCATGCTCTGGCTGGACTTGGC-3' (amorce #3, figure 2) et antisens 5'-CCTGGCTGTGCTGCTGGTACTGA-3' (amorce #9, figure 2) ont été conçues d'après la séquence de la ghreline humaine et selon les régions d'homologies supérieure à 90 % (20 nt / 22 nt et 21 nt / 23 nt respectivement) entre les séquences de ghreline de rat (rGhreline) et

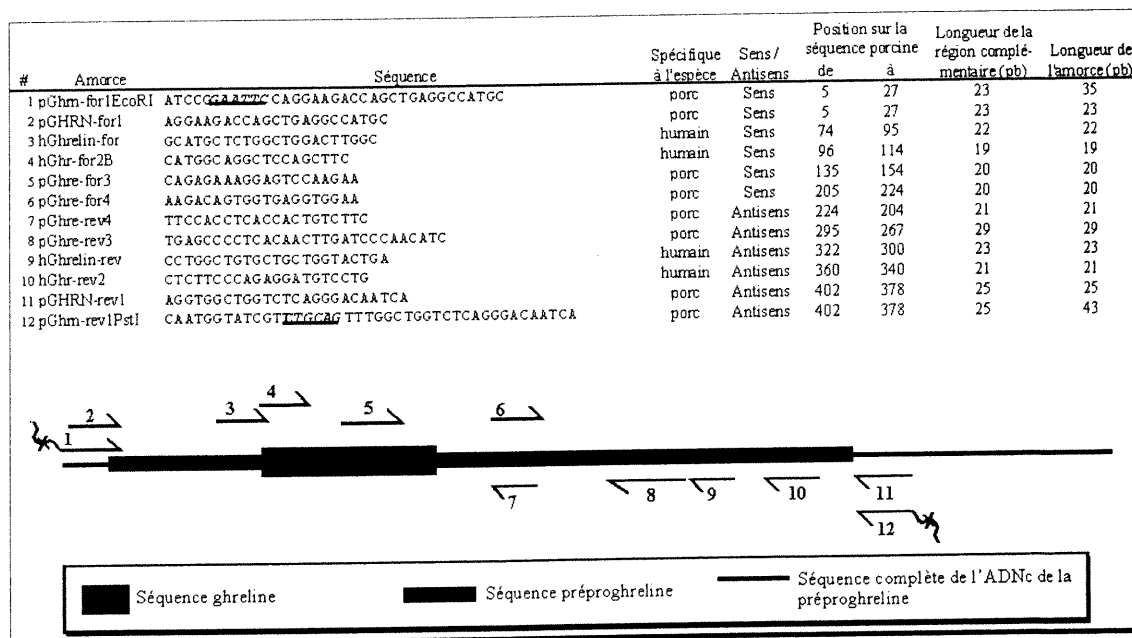


figure 2 : Séquence des amorces utilisées dans les amplifications de l'ADNc de la ghreline porcine et représentation de la position relative de chacune des amorces par rapport à cette ADNc.

^a <http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/clustalw/>, consulté au courant de l'année 2000.

d'humain (hGhreline) (58). Une fraction, soit 1/10, de la banque d'ADNc (section 3.2.1.3, page 30) a servi de matrice pour l'ACP (section 3.2.1.4, page 30). Les températures d'annealing ont couvert un intervalle de température décroissante, allant de 55 à 45 °C, pour 40 cycles et des temps de stades de 45 secondes chacun.

3.2.1.4.3. 2^{ème} étape : ACP semi-emboîtée

L'amorce sens 5'-CATGGCAGGCTCCAGCTTC-3' (amorce #4, figure 2, page 32) a été générée d'après la séquence humaine de la ghreline et selon les régions d'homologies à plus de 94 % (18 nt / 19 nt) entre les séquences de rGhreline et hGhreline (58). En utilisant cette amorce en plus de la même amorce antisens identifiée en 3.2.1.4.2 (amorce #9, figure 2, page 32), une ACP semi-emboîtée, selon les mêmes conditions qu'en 3.2.1.4.2 (page 32), a été exécutée sur 1/100 des produits d'amplification obtenus à l'étape 1, en 3.2.1.4.2 (page 32). Cette ACP a permis de repêcher pour la première fois un fragment de l'ADNc de la ghreline porcine pour en identifier sa séquence.

3.2.1.4.4. 3^{ème} étape : 3' RACE et 5' RACE

Le bout 3' de l'ADNc de la ghreline fut amplifié par ACP (section 3.2.1.4, page 30) avec la même amorce sens qu'en 3.2.1.4.3 et l'amorce antisens oligo(dT)₂ (Canadian Life Technologies®). La matrice utilisée était la banque d'ADNc d'estomac de porc (section 3.2.1.3, page 30). Les paramètres d'amplification ont été les mêmes qu'en 3.2.1.4.2 à la page 32.

Le trousse commercial 5' RACE de Canadian Life Technologies® (été 2000) fut nécessaire à la révélation du fragment de l'extrémité 5'. La méthodologie proposée dans la trousse fut observée sans modification, y compris l'ACP semi-emboîtée suggérée. Les

amorces antisens propres à notre application sur la ghreline, définies comme étant GSP1, GSP2 et GSP3 par la méthodologie de la trousse, sont décrites comme suit : GSP1 : 5'-CCT-GGCTGTGCTGCTGGTACTGA-3' (amorce #9, figure 2, page 32), GSP2 5'-TGAGCCCC TCACA ACTTGATCCCAACATC-3' (amorce #8, figure 2) et GSP3 : 5'-TTCCACCTCAC-CACTGTCTTC-3' (amorce #7, figure 2). GSP1 était la même amorce (antisens) qu'en 3.2.1.4.2, page 32 (amorce #9, figure 2), ainsi spécifique à l'humain, mais les amorces GSP2 et GSP3 étaient spécifiques et conçues selon la séquence porcine obtenue suite au 3' RACE. Les ACP ont été réalisées en utilisant les mêmes paramètres qu'en 3.2.1.4.2 (page 32).

3.2.1.4.5. 4^{ème} étape : clonage de l'ADNc de la ghreline porcine

Une fois la séquence de l'ADNc de la ghreline porcine identifiée en entier par l'agencement des fragments 3' et 5' se chevauchant, une amplification par ACP pour récupérer la séquence entière (comme en 3.2.1.4, page 30) fut pratiquée sur 1/20 d'une génothèque complémentaire (définie en 3.2.1.3, page 30). La température d'annelage était située à 55 °C, les temps de stades étaient de 45 secondes et 35 cycles furent nécessaires à l'amplification.

Deux amplifications ont été réalisées avec deux paires d'amorces semblables, la différence étant l'ajout de sites d'endonucléases de restriction sur une des paires. Elles ont mené à deux produits d'amplification semblables qui ont servi à leur intégration dans pCMV selon deux processus différents. Les amorces sans sites de restrictions sont les suivantes : l'amorce sens 5'-AGGAAGACCAGCTGAGGCCATGC-3' (amorce #2, figure 2, page 32) et l'amorce antisens 5'-AGGTGGCTGGTCTCAGGGACAATCA-3' (amorce #11, figure 2) et la deuxième paire d'amorces comprenant des sites d'endonucléases de

restriction : l'amorce sens EcoRI 5'-ATCCGGAATTCCAGGAAGACCAGCTGAGGCCA-TGC-3' (amorce #1, figure 2) et l'amorce antisens possédant le site de restriction PstI 5'-CAATGGTATCGTTCTGCAGTTTGGCTGGTCTCAGGGACAATCA-3' (amorce #12, figure 2).

3.2.2. INCORPORATION DE L'ADNC DE LA GHRELIN PORCINE DANS pCMV

Préalablement, chacun des produits amplifiés a été incorporé dans pGEM[®]-T Easy (section 3.2.3.6, page 40) pour procéder à un séquençage initial. Les séquençages de vérification des ADNC de la ghrelina de porc ont mené à l'identification de deux séquences : celle de la préproghrelina(1-28) et celle de la préproghrelina(1-27)(dés-Gln¹⁴). Nous avons réalisé l'incorporation des deux séquences dans le pCMV, tout en s'assurant de pouvoir les différencier facilement. Ainsi, pour incorporer la ghrelina porcine dés-glutamine¹⁴ (pGhrelin Δ Q¹⁴) dans le vecteur d'expression eucaryote, dénommé pCMV, nous avons procédé à une digestion partielle de 5 μ g pGEM[®]-T Easy contenant pGhrelin Δ Q¹⁴ (figure 3, page 36). Une incubation de 20 minutes à 37 °C avec 15 U de EcoRI (section 3.2.3.10, page 42) a suffi à obtenir le plasmide linéaire à simple coupure, sans engendrer trop de double coupures. Ce plasmide linéaire a été isolé du plasmide circulaire en achevant une séparation sur agarose 0,8 % (section 3.2.3.3, page 38) suivi d'une purification (section 3.2.3.2, page 38). Le plasmide linéaire a subi en deuxième lieu une digestion complète avec PstI (section 3.2.3.10, page 42). Le fragment ~400 pb de pGhrelin Δ Q¹⁴ fut alors isolé et purifié sur gel d'agarose 1,5 % (se référer aux sections 3.2.3.2 et 3.2.3.3, page 38).

Parallèlement, le plasmide pCMV_pGRF (obtenu d'un projet précédent, voir en 3.1, page 28) a subi une digestion double EcoRI et PstI (section 3.2.3.10, page 42). Le vecteur

linéaire fut séparé sur gel 1,5 % agarose, isolé et purifié (se référer aux sections 3.2.3.2 et 3.2.3.3, page 38).

Le fragment et le vecteur, tous deux à bouts collants compatibles et engendrant une ligature^a unidirectionnelle, furent ligaturés^b ensemble avec la ligase et le tampon de ligature de la trousse décrit en 3.2.3.6 (page 40). Le plasmide pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ a ainsi été obtenu.

Alternativement, l'incorporation de pGhrelin(1-28) dans pCMV se fit par une ACP pratiquée sur pGEM[®]-T Easy qui avait été initialement séquencé et identifié comme portant la pGhrelin(1-28). L'ACP fut suivie d'une digestion et d'une ligature (voir figure 3, page 36). Un cinquième du produit d'amplification, découlé d'une paire d'amorces ayant des sites de restrictions inclus (décrit en 3.2.1.4.5, page 34), a subi une double digestion (EcoRI et PstI, section 3.2.3.10, page 42). Ce fragment de digestion fut purifié selon 3.2.3.1 (page 37). La ligature de ce produit avec le vecteur pCMV (EcoRI 3', PstI 5' décrit ci-haut) fut achevée pour obtenir le vecteur pCMV_pGhrelin, de la même façon que décrit dans le paragraphe précédent.

Ainsi, deux constructions plasmidiques ont été réalisées, soient : pCMV_pGhrelin et pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴.

^a ligature n. f., domaine : biologie (anglais : ligation), déf. : formation d'une liaison phosphodiester entre deux polynucléotides. Note : cette réaction est catalysée par une ligase. [1994], www.granddictionnaire.com, consulté le 02 mai 2002.

^b ligaturer v., domaine : biologie (anglais : ligate, to), terme(s) à éviter : liguer, déf. : Action de former une liaison phosphodiester entre deux polynucléotides. [1994], www.granddictionnaire.com, consulté le 02 mai 2002.

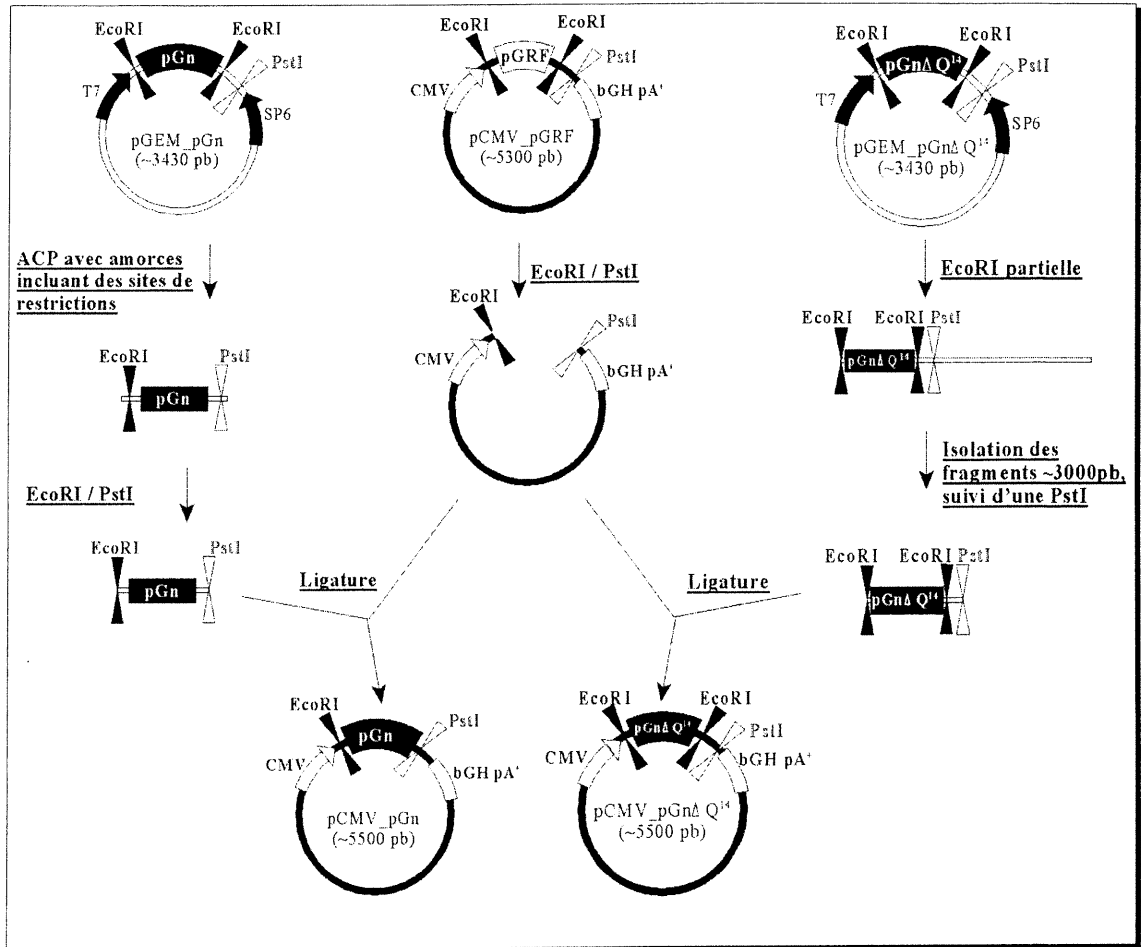


figure 3 : Diagramme de synthèses alternatives de pCMV_pGhrelin et de pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴. Les synthèses mènent à deux plasmides semblables dont le site EcoRI en aval (en 3') est absent dans pCMV_pGhrelin.

3.2.3. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE COMMUNES ET PARTAGÉES DANS PLUSIEURS SECTIONS

La section qui suit, décrit toutes les manipulations qui ont été réalisées à plusieurs reprises et qui sont communes à plusieurs étapes de la section matériel et méthodes. Elles ont été rassemblées dans cette section afin d'améliorer la compréhension du texte.

3.2.3.1. Purification sur colonne des produits d'amplification

La purification des produits d'amplification a été réalisée à l'aide de la trousse «QIAquick PCR Purification Kit» (Qiagen®) sans modification au protocole décrit. La

purification permettait de séparer les produits d'amplification des enzymes, des tampons, des sels, des nucléotides et des amorces.

3.2.3.2. Purification sur colonne des fragments d'ADN isolés sur gel d'agarose

La purification des fragments d'ADN préalablement isolés sur gel d'agarose a été réalisée à l'aide de la trousse «QIAquick Gel Extraction Kit» (Qiagen®) selon le protocole décrit. Elle a permis d'isoler les fragments d'ADN de l'agarose.

3.2.3.3. Gel d'agarose

Les gels d'agarose étaient préparés avec du 1X TAE (40 mM Trisacétate, 1 mM EDTA, pH 8.3) et teints de 0,5 µg/mL EtBr. La concentration d'agarose était variable, entre 0,8 % et 1,5 % (p/v). Une concentration élevée d'agarose (~1.5%) servait à la séparation et à l'analyse de fragments de 100 à 1000 pb, tandis qu'une concentration faible autour de 1 % était utile à l'analyse des plasmides ou des fragments > 1000 pb.

Un transformateur (Powerpac 200, Biorad) procurait une différence de potentiel de 5 à 7,5 V/cm dans une boîte de migration (minisub^{MC} DNA cell, Biorad). La migration durait généralement 30 à 60 minutes selon le degré d'analyse et le voltage impliqué et les gels étaient par la suite photographiés (Foto/Analyst^{MC}, muni d'une boîte à rayons UV Foto/Eclipse^{MC}, Fotodyn® Inc exploité par un ordinateur MacIntosh Ici et du logiciel Fotodyn v1.1 branché à une imprimante Mitsubishi P40U).

Les critères d'évaluation de la qualité et de la quantité étaient basés sur la comparaison visuelle de l'intensité des bandes d'intérêts avec les bandes de marqueurs de poids moléculaires 1 Kb Plus^{MC} et DNA Mass Ladder^{MC} (Canadian Life Technologies®).

3.2.3.4. Spectroscopie par absorbance

Pour les quantifications par spectroscopie par absorbance, une portion de l'ADN ou de l'ARN à analyser a été diluée 1:100 et 1:500 dans de l'eau distillée filtrée (dH₂O MilliQ) et autoclavée. Chacune des lectures était accomplie en duplicata. Des cuvettes en quartz (Beckman) de 500 µL servait à la lecture de l'absorbance à $\lambda = 260$ nm et $\lambda = 280$ nm avec un spectrophotomètre UV / visible (Spectrotronic® 1001plus, Milton Roy).

La constante d'absorbivité utilisée pour déterminer la concentration de l'ADN double brin était $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Une estimation de la qualité de celle-ci se faisait en effectuant le ratio A_{260}/A_{280} , où un ratio se rapprochant de 1,8 à 2,1 démontre une pureté accrue.

De même, les constantes d'absorbivité pour l'ARN et les amorces d'ADN étaient respectivement de 40 et de $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

3.2.3.5. Séquençage

Tous les séquençages furent effectués par l'équipe de Jean Renaud du Service de séquençage du département de Recherche en sciences de la vie et de la santé de l'Université Laval (Québec, Québec, Canada). Les quantités et concentrations d'ADN à séquencer étaient présentées selon les spécificités de ce service décrites sur leur site Internet ^a. Seuls des produits d'ACP purifiés (se référer aux sections 3.2.3.1 et 3.2.3.2, page 38) ou des plasmides préparés comme en 3.2.3.11 (page 42) ont servi au séquençage.

Le séquençage pour des fins de criblage (c'est-à-dire généralement les clones insérés

^a <http://nucleus.rsvs.ulaval.ca:8000/>

dans pGEM[®]-T Easy) se faisait de façon unidirectionnelle uniquement. L'amorce choisie arbitrairement était celle propre au promoteur T7 (5'-TAATACGACTCACT ATAGGG-3').

Toutefois, les séquençages servant à confirmer l'exactitude d'une séquence dans pGEM[®]-T Easy se faisaient en lecture sens et antisens avec les amorces propres aux promoteurs T7 et SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3').

Les séquences lues dans pCMV se faisaient à partir du promoteur T7 en lecture sens seulement.

3.2.3.6. Incorporation de fragments d'ADNc dans pGEM[®]-T Easy

La trousse de Promega Corp. (Madison, WI, USA), «pGEM[®]-T Easy Vector System», a servi à incorporer les produits d'amplification selon le protocole fourni. Le ratio molaire 1:3 (plasmide : insert) a suffi à ligaturer le plasmide avec notre insert et de le rendre circulaire. La ligature fut facilitée par les bouts collants présentés par les thymidines flottantes en 3' que possède le vecteur pGEM[®]-T Easy et par les adénosines flottantes en 5' des produits d'amplification.

3.2.3.7. Milieu de culture LB et LB Agar

Les solutions de milieu de culture bactérien LB étaient préparées en ajoutant 10 g/L de NaCl, 10 g/L Bacto[®] Tryptone (GiBCo BRL), 5 g/L Bacto[®] Yeast Extract (GiBCo BRL) à dH₂O MilliQ, autoclavé la journée même et conservées à la température de la pièce de façon stérile. Si nécessaire, de l'ampicilline était ajoutée à une concentration de 100 µg / mL de LB.

Les solutions pour les géloses de LB Agar étaient préparées en ajoutant à une solution de LB (comme préparé ci-haut), 15 g/L de Bacto[®] Agar (GiBCo BRL). Les

solutions étaient autoclavées la journée même, refroidies à au moins $\sim 40^{\circ}\text{C}$, supplémentées avec $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline et distribuées de façon stérile dans des pétries de 10 cm de diamètre et conservées à 4°C .

3.2.3.8. Transformation

Un dixième d'une ligature était utilisé pour une transformation de bactéries compétentes XL-1 gracieusement fournie par le laboratoire du Dr Bruce Murphy. Les transformations de type «heat shock» se sont déroulées de la façon suivante : $\sim 10\ \text{ng}$ de plasmide circularisé était ajouté à $\sim 50\ \mu\text{L}$ XL-1 ; après une incubation de 20 minutes sur glace, le produit fut mis pendant 1 minute à 37°C et ensuite retourné sur glace le temps d'ajouter 1 mL de LB (section 3.2.3.7, page 40) sans antibiotique ; suivait ensuite une incubation à 37°C avec un mouvement de rotation à 220 rpm pendant une heure. Les bactéries traitées étaient appliquées en différentes quantités sur une gélose LB Agar + ampicilline. La croissance sélective se poursuivait dans un incubateur bactériologique (Blue M, Electric Company, Blue Island, Ill) à 37°C pendant 16 à 20 heures.

3.2.3.9. Criblage de clones

3.2.3.9.1. Clones compris dans pCMV

La présence de l'insertion comprise dans les clones pCMV était vérifiée en achevant une digestion avec EcoRI et/ou PstI (section 3.2.3.10) sur les ADN plasmidiques isolés tel que décrit en 3.2.3.11 (page 42).

L'authenticité des insertions pGhrelin(1-28) ou pGhrelin ΔQ^{14} fut vérifiée selon les profils sur gel 1,5 % agarose (section 3.2.3.3, page 38) spécifiques à la ghreline et au

plasmide pCMV suite à la digestion par endonucléases de restriction NcoI et PvuII (section 3.2.3.10. Se référer à la figure 6 (dans la section Résultats, page 62) pour l'illustration des sites de restrictions.

3.2.3.9.2. Clones compris dans pGEM[®]-T Easy

Une fois l'ADN plasmidique isolée (mini-prep, section 3.2.3.11, page 42), le criblage des clones pGEM[®]-T Easy + insert se faisait par digestion (section 3.2.3.10) à l'aide d'endonucléases EcoRI, coupant de part et d'autre du site de clonage. Une migration sur gel d'agarose suivait les digestions, ce qui permettait une visualisation des profils de digestions pour fin de criblage. Se référer à la figure 6 (dans la section Résultats, page 62) pour l'illustration des sites de restriction.

3.2.3.10. Digestion par endonucléases

Toutes les endonucléases de restrictions ont été acquises de Pharmacia^{MC} (Amersham Pharmacia Biotech Inc.).

De façon générale, les méthodologies fournies par le manufacturier étaient suivies. Les quantités d'ADN, les temps d'incubation ainsi que les quantités d'endonucléases pouvaient varier selon les applications. Pour ce qui est des digestions doubles, soient avec EcoRI et PstI, le tampon fourni pour chacune de ces enzymes était le même.

Au besoin, les endonucléases étaient inhibées à la chaleur, à 65 - 70 °C, pendant 5 à 10 minutes.

3.2.3.11. Préparations d'ADN plasmidique (Mini-prep et Giga-prep)

Après l'étape 3.2.3.8 (page 41), un nombre variable de colonies (~ 6 à 10) choisies

au hasard servaient à inoculer des cultures de LB + ampicilline (telles que décrites en 3.2.3.7, page 40) pour une préparation d'ADN plasmidique de petite échelle nommée «mini-prep». Environ 3 mL de culture suffisaient. Ces cultures inoculées étaient mises sous conditions favorables de croissance bactérienne dans un incubateur agitateur-secoueur (Orbital Shaker, Forma Scientific), à une rotation de 220 rpm à 37 °C pendant 16 à 20 heures. Seulement une portion de ces cultures a servi à l'isolement d'ADN plasmidique.

Les mini-preps d'ADN plasmidique ont été apprêtées à l'aide de deux kits, selon les méthodologies respectives basées sur la lyse alcaline. Le kit «QIAprep Spin Miniprep» (Qiagen®) servait aux applications demandant une qualité d'ADN plus pures (e.g. séquençage), tandis que le kit «Concert^{MC} Rapid Plasmid Miniprep System» (Canadian Life Technologies®) était utilisé pour les ADN allant servir aux criblages de clones (e.g. digestion). Habituellement, 1,5 mL de culture bactérienne (préparée comme décrit précédemment) suffisait à produire approximativement 20 µg d'ADN plasmidique. Une vérification de la qualité et de la quantité des produits obtenus était réalisée sur gel d'agarose ~ 1 % (section 3.2.3.3, page 38). Au besoin, une spectroscopie s'imposait (section 3.2.3.4, page 39).

Les préparations à grande échelle de type giga-prep ont été réalisées avec la trousse «Endofree^{MC} Plasmid Giga kit» (Qiagen®). Cette préparation demandait l'utilisation de verrerie et de contenants exempts d'endotoxine, c'est-à-dire de la verrerie neuve ou chauffée à 180 °C pendant 24 heures ou des contenants de plastique neufs uniquement. Le protocole fourni fut observé. Approximativement 2,5 L de culture bactérienne (section 3.2.3.7, page 40 et description précédente) était nécessaire afin de produire plus de 15 mg d'ADN plasmidique. Une vérification de la qualité et de la quantité a été réalisée sur gel d'agarose

~ 1 % (section 3.2.3.3) en plus d'une spectroscopie (section 3.2.3.4, page39). Une vérification de l'authenticité du clone isolé a été accomplie selon 3.2.3.9.1 (page 41).

3.3. TRANSFECTION *IN VITRO* ET *IN VIVO*

3.3.1. TRANSFECTION *IN VITRO*

Deux transfections *in vitro* ont été réalisés et ont précédé les transfections *in vivo* afin d'évaluer la sécrétion de peptides. Ces transfections ont été accomplies par des tierces parties. Certains détails précis sont ainsi non disponibles.

3.3.1.1. pGRF

Une transfection *in vitro* fut effectuée par un autre laboratoire. Le vecteur pCMV_pGRF a servi à la transfection à l'aide de LipofectAce® (Canadian Life Technologies®) selon les recommandations du manufacturier. Les milieux de culture ont été récoltés après incubation de 24 heures pour ensuite procéder au dosage du pGRF (section 3.4.1.2, page 55).

3.3.1.2. pGhrelin Δ Q¹⁴

Une transfection *in vitro* fut gracieusement effectuée par M Nicolas Gévry du laboratoire du Dr Bruce D. Murphy (CRRA, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal). Des cellules adrénocarcinomiales de souris dans des plaques de 24 puits ont été transfectées avec 100 ng pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ et de l'Effectene^{MC} (Qiagen®) selon les recommandations du manufacturier, en parallèle avec des cellules non-transfectées. Une incubation à 37 °C pendant 24 heures a précédé les récoltes. Les milieux de cultures ont été

récoltés et les cellules ont été récoltées par une remise en suspension dans 500 µL de PBS (Canadian Life Technologies®). Les milieux de cultures et les cellules ont été conservés séparément dans des micro-tubes de 1,5 mL et congelés à -20 °C.

3.3.2. TRANSFECTION *IN VIVO*

Les manipulations d'animaux pour les transfections *in vivo* sont décrites en détails dans la section suivante. Toutefois, puisque les modes d'administration et les dispositifs d'administration sont parfois répétés, ils y sont décrits précisément dans la section présente.

3.3.2.1. Mode d'administration

Un mode d'administration est défini comme étant une façon selon laquelle un médicament, dans le cas présent l'ADN, est introduit dans l'organisme^a. Les modes d'administration comprennent, par exemple, les injections intramusculaires, la perfusion intraveineuse, l'inhalation, la pulvérisation et l'absorption percutanée^a.

3.3.2.1.1. Intramusculaire

Les solutions de transfection ont été préparées avec du PBS pH7,2 stérile (Canadian Life Technologies®) dont les concentrations en ADN étaient de 1 µg/µL et de 2 µg/µL, respectivement pour pCMV_pGhrelinΔQ¹⁴ et pCMV_pGRF. Chez la souris, 50 µg de pCMV_pGRF était injecté i.m. dans le muscle *gastrocnemius* (section 3.3.2.3.1, page 49). Chez le rat anesthésié, une dose de 1 mg/kg pCMV_pGhrelinΔQ¹⁴ et/ou de 2 mg/kg

^a Office de la langue française (1999), dans *Le grand dictionnaire terminologique*, www.granddictionnaire.com.

pCMV_pGRF était injectée à un seul et unique site avec une aiguille de 25G1/2” dans le muscle *quadriceps femoris*.

3.3.2.1.2. *Électrotransfert génique (GET)*

Au jour 0, les animaux recevant le mode de traitement par électrotransfert génique (GET) étaient anesthésiés au pentobarbital (section 3.3.2.3.2, page 52). Le GET a été exercé sur des muscles dont la peau avait été exposée (section 3.3.2.3.2, page 52). L'appareil BTX 820 Squareporator (BTX Instrument, San Diego, CA, USA), a été utilisé spécifiquement à cause de sa capacité de produire un voltage contrôlé et constant pouvant être décrit par des hausses ou des chutes de différence de potentiel instantanées, d'où son appellation «à ondes carrées». Des «ondes carrées» ont démontré une meilleure efficacité de transfection et surtout une diminution du dommage tissulaire comparativement à des ondes où le voltage augmente ou diminue graduellement. Des électrodes-accessoires reliées à ce même appareil ont été conçues et fabriquées localement avec des aiguilles 25G1/2” enroulées de fils de cuivre. Moins de 60 secondes après l'injection, une série de quatre pulsations de 20 ms, à une fréquence de 1 Hz et d'une amplitude de 200 V/cm, fut administrée. Une deuxième série fut ensuite administrée dans la polarité opposée sans changer l'emplacement des aiguilles. Le changement de polarité s'est fait en inversant les fils des aiguilles-électrodes à l'appareil même. Les aiguilles-électrodes étaient insérées de part et d'autre du site d'injection de la solution de traitement, traçant une droite parallèle aux fibres musculaires, distancées d'environ 1 cm, à une profondeur approximative de 5 mm sous la peau (voir la figure 4, page 47).

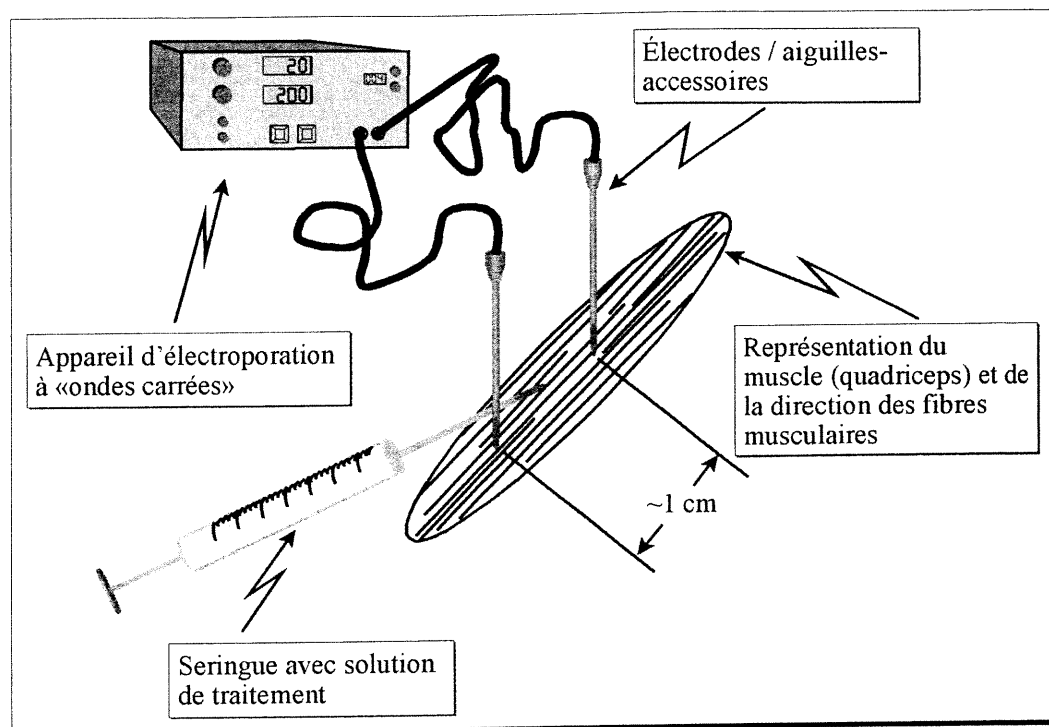


figure 4 : Représentation de la manipulation d'électrotransfert génique (GET) intramusculaire. Cette représentation montre un muscle exposé. Durant les manipulations, le muscle n'a pas été exposé, i.e. l'insertion des aiguilles et des aiguilles-électrodes s'est faite à travers la peau.

3.3.2.1.3. Intraveineux

Chez la souris seulement, 100 μ L de la solution de traitement contenant 50 μ g de pCMV_pGRF dans du PBS pH7,2 stérile (Canadian Life Technologies®) \pm DOTAP-Cl (section 3.3.2.2.2, page 48) était injecté i.v. tel que décrit à la section 3.3.2.3.1 (page 49).

3.3.2.1.4. Transfection par hydrodynamisme (HD)

Un volume correspondant à 10 % du poids corporel de la souris (67) était injecté i.v. tel que décrit en 3.3.2.3.1 (page 49). Une quantité fixe de 10 μ g de pCMV_pGRF \pm DOTAP-Cl (section 3.3.2.2.2) diluée dans du PBS pH7,2 stérile (Canadian Life Technologies®) était injectée à chaque souris.

3.3.2.2. Dispositifs d'administration

Un dispositif d'administration se définit comme étant une forme pharmaceutique utilisée pour introduire ou libérer un médicament, dans le cas présent l'ADN, dans l'organisme^a. Les dispositifs d'administration comprennent, par exemple, les aérosols-doseurs, les inhalateurs de poudre sèche, les nébuliseurs, les implants, les timbres transdermiques, les comprimés osmotiques, les comprimés matriciels et les comprimés retard^a.

3.3.2.2.1. Spermidine

Des solutions ont été préparées à deux concentrations d'ADN et avec ou sans spermidine, pour faire quatre solutions différentes. Les concentrations d'ADN de pCMV_pGRF était de 1 mg/mL et 0,2 mg/mL et la concentration finale de spermidine a été fixée à 11,5 mM (53) spermidine (# cat S2626, Sigma Chemical). Ces solutions ont été préparées à l'avance, soit douze heures précédemment à la transfection *in vivo*, et incubées à 4 °C afin de permettre une stabilisation et une complétion de la structure des génomes (ADN+lipide) (53).

3.3.2.2.2. DOTAP

Le lipide synthétique DOTAP-Cl (Northern Lipids Inc., Vancouver, C.-B.) sous forme solide a été utilisé pour préparer une solution stock de 150 mM dans du CHCl₃. Une préparation correspondant à 900 nmol de DOTAP-Cl par dose (94) a été séchée dans un

^a Office de la langue française (1999) dans *Le grand dictionnaire terminologique*, www.granddictionnaire.com.

SpeedVac® (Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA) pendant 2 heures puis solubilisée à nouveau dans 25 µL / dose de PBS pH7,2 (Canadian Life Technologies®). La solution fut ensuite homogénéisée pendant deux à trois minutes avec un Polytron® (PT1200, Kinematica AG, Suisse) à 20 000 rpm. Une dose de DOTAP était alors ajoutée à la quantité désirée d'ADN et le volume ajusté selon les besoins et ensuite vortexée. Cette solution ne pouvait être conservée pour plus de 12 heures à 4 °C.

3.3.2.3. Animaux

Préalablement à chacune des manipulations animales, le protocole a été approuvé par le Comité institutionnel de déontologie animale de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal.

3.3.2.3.1. Souris

Dans le cas de l'évaluation de la spermidine, de jeunes souris (CD-1®, Charles River Laboratories, Saint-Constant, Qc) mâles d'environ 28 jours étaient gardés à l'animalerie de l'Université Laval (Québec, Québec). Les souris étaient gardées dans cinq cages de dimensions 15 cm hauteur x 25 cm largeur x 45 cm profondeur dans lesquelles les poids étaient répartis selon une distribution normale et égale. Les animaux avaient accès *ad libitum* à de la nourriture commerciale et à de l'eau provenant du système local d'aqueduc.

Vingt-et-une souris ont été répartis également selon les poids en cinq traitements (cinq souris pour le groupe témoin) ; un groupe témoin recevant aucun traitement, deux groupes recevant 20 µg de pCMV_pGRF par voie i.m. (section 3.3.2.1.1, page 45) avec ou sans spermidine (section 3.3.2.2.1, page 48) et deux autres groupes recevant 100 µg de pCMV_pGRF par voie i.m. (section 3.3.2.1.1, page 45) avec ou sans spermidine (section

3.3.2.2.1, page 48). Ce traitement a été exécuté au jour 0 et l'évaluation s'est terminée au jour 7.

Dans le cas de l'évaluation du DOTAP, de jeunes souris (CD-1[®], Charles River Laboratories, Saint-Constant, Qc) mâles de 21 jours étaient gardés au complexe de bio-évaluation de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal où la température était fixée à $21,0 \pm 0,2$ °C et le temps de lumière réglé de 05h00 à 19h00. Les 35 souris ont été gardées dans cinq cages de dimensions 15 cm hauteur x 25 cm largeur x 45 cm profondeur. Les animaux avaient accès *ad libitum* à de la nourriture commerciale et à de l'eau provenant du système local d'aqueduc.

Chacun des traitements était représenté par cinq souris et la distribution s'est faite pour que les sept souris d'une même cage aient un poids similaire. Sept traitements ont été réalisés : un groupe témoin recevant du PBS pH7,2 stérile (Canadian Life Technologies[®]) par voie i.m., deux groupes recevant 50 µg de pCMV_pGRF par voie i.m. (section 3.3.2.1.1, page 45) avec ou sans DOTAP-Cl (section 3.3.2.2.2, page 48), deux groupes recevant 10µg de pCMV_pGRF par voie i.v./HD (~1,0 à 1,5 mL) (section 3.3.2.1.4, page 47) avec ou sans DOTAP-Cl (section 3.3.2.2.2, page 48) et deux autres groupes recevant 50 µg de pCMV_pGRF par voie i.v. (section 3.3.2.1.3, page 47) avec ou sans DOTAP-Cl (section 3.3.2.2.2, page 48). Ces traitements ont été répétés au jour 7, 14 et 21.

Le poids des souris au jour 0 dans chacun des traitements, énumérés dans le même ordre que ci-haut, de $12,7 \pm 2,3$ g ; $12,3 \pm 2,2$ g ; $12,8 \pm 3,0$ g ; $12,7 \pm 2,6$ g ; $12,7 \pm 2,4$ g ; $12,1 \pm 2,2$ g et $11,9 \pm 2,1$ g. Les souris étaient pesées (balance model Z-40, Pelouze Scale Co., Evanston, Ill, USA) aux deux à trois jours et lors des manipulations pour les injections, la pesée se faisait prioritairement.

Les injections intra-veineuses faites par une des veines caudales latérales étaient facilitées par une hyperthermie des animaux provoquée par leur exposition à une source de chaleur, apportée par une lampe située à approximativement 30 cm au-dessus de la cage, jusqu'à ce qu'un léger halètement et une hypersalivation soient notés. Les souris étaient alors placées dans un entonnoir dégageant la queue. Une seringue de type insuline (½ mL, 27G½") permettait l'injection du volume de solution de traitement. Toutefois, une seringue de 3 mL avec une aiguille de 27G½" servait aux injections de type HD (section 3.3.2.1.4, page 47). Pour le groupe des souris injectées par voie intra-musculaire, elles ont subi le même traitement thermique. Ensuite, elles étaient placées dans un entonnoir modifié, qui laissait passer le membre postérieur d'intérêt, pour un contrôle complet et une pleine maîtrise. Une seringue de type insuline (½ mL, 27G ½") permettait d'injecter le volume de solution de traitement.

Au jour du sacrifice, sous anesthésie au pentobarbital sodique (Somnotol^{MC}, Bimeda-MTC Santé Animale Inc, Cambridge, Ont.) (40 mg/kg, i.p.), un volume d'environ 1 mL de sang était prélevé par ponction intra-cardiaque avec des seringues de 3 mL et des aiguilles 25G5/8". Aussitôt, les tissus d'intérêts (poumons, foie, muscles) ont été excisés. Les animaux furent euthanasiés par dislocation cervicale immédiatement après les prélèvements. Le sang fraîchement récolté a été transféré dans des tubes pré-refroidis sur glace (Vacutainer®, 3 mL, 0,068 mL, 7,5 % K₃EDTA, Becton Dickinson & Co, Franklin Lakes, NJ), a été mélangé doucement, par inversion, à l'EDTA et conservé sur glace aussitôt. Tous les échantillons de sang ont été centrifugés (J-6M/E, Beckman) à 4 °C pendant 15 minutes à 2500 rpm (~1300x g) pour en récolter le plasma EDTA séparé en trois aliquotes d'au moins 100 µL et conservés à -20 °C.

D'autre part, les tissus fraîchement excisés ont rapidement été mis dans des tubes de polypropylène de 1,5 mL, congelés immédiatement dans l'azote liquide (N₂(l)) et conservé à -70 °C.

3.3.2.3.2. Rats

Des rats adultes de 135 jours, de race Sprague Dawley, acclimatés aux manipulations depuis plusieurs semaines, étaient gardés au complexe de bio-évaluation de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. La température était fixée à 21,0 ± 0,2 °C et le temps de lumière réglé de 05h00 à 19h00. Au jour -1, les 13 mâles et 17 femelles ont été pesés et répartis dans les quatre groupes de traitements selon une distribution normale et égale de poids. Chaque cage (15 cm hauteur x 35 largeur x 35 cm profondeur) comptaient deux animaux de même sexe mais de traitements différents. Les rats avaient accès *ad libitum* à la nourriture commerciale et à l'eau provenant du système local d'aqueduc tout au long du suivi de 18 jours.

Les quatre traitements consistaient en des groupes de trois mâles et quatre femelles (quatre mâles et cinq femelles pour le groupe combiné) où ils recevaient tous une dose par voie i.m. dans le *quadriceps femoris* gauche (gauche et droit dans le cas du groupe combiné) (décrit en 3.3.2.1.1, page 45) en plus de l'électrostimulation (décrite en 3.3.2.1.2, page 46). Les quatre groupes ont été définis comme suit : un groupe témoin recevant du PBS pH7,2 stérile (Canadian Life Technologies®), un groupe recevant pCMV_pGRF 2 mg/kg, un groupe recevant pCMV_pGhrelinΔQ¹⁴ à 1 mg/kg et un groupe recevant une combinaison : 2 mg/kg de pCMV_pGRF dans le membre gauche et 1 mg/kg de pCMV_pGhrelinΔQ¹⁴ dans le membre droite.

Un rasage des sites de ponction, c'est-à-dire les régions entourant les clavicules et le cou pour les prises de sang et des sites d'injections et d'insertion pour la GET (cuisse gauche et/ou droite) (section 3.3.2.1.2, page 46), a été réalisé.

Suite au traitement GET au jour 0, le sang était prélevé des rats sur une durée d'une heure aux jours 3, 10 et 17. Trois prélèvements sur une période d'une heure ont été préférés à un prélèvement ponctuel. Pour chacun des rats, la moyenne des niveaux de rST pour ces périodes d'une heure a été calculée afin d'obtenir le niveau basal de rST stimulé ou non. Le prélèvement s'est fait sous anesthésie au pentobarbital sodique (Somnotol^{MC}, Bimeda-MTC Santé Animale Inc, Cambridge, Ont.) (40 mg/kg, i.p.) puisque le pentobarbital inhibe la somatostatine hypothalamique (91) et permet ainsi un relâchement de l'inhibition de la ST. Le temps zéro du profil sanguin débutait 30 minutes après l'injection de l'anesthésiant. Durant ces premières 30 minutes, le rat inerte était pesé (balance modèle YG-700, Pelouze Scale Co., Evanston, Ill, USA), rasé au besoin et la région de prélèvement était désinfectée avec de l'alcool isopropylique. Les prises de sang étaient exécutées aux temps 0, 30 et 60 minutes. Les prélèvements sanguins étaient faits avec des seringues de 3 mL muni d'une aiguille 25G5/8" à partir d'une des jugulaires situées tout près d'une clavicule. Le sang récolté (≤ 1 mL) était transféré dans des tubes pré-refroidis sur glace (Vacutainer[®] 3 mL, 0,068 mL, 7,5 % K₃EDTA, Becton Dickinson & Co, Franklin Lakes, NJ). Le sang a été mélangé doucement, par inversion, à l'EDTA en solution et mis sur glace aussitôt. Une centrifugation du sang a été accomplie à 4 °C pendant 15 minutes à 2500 rpm (~1300x g) (J-6M/E, Beckman). Le plasma EDTA isolé a été séparé en trois aliquotes d'au moins 100 μ L et conservé à -20 °C.

Étant donné les possibilités d'hypothermie associées à l'anesthésie, une lampe infra-rouge était placée à environ 60 cm des rats anesthésiés pour la durée du prélèvement. Après le prélèvement, les rats ont été rassemblés dans leur cage respective où ils ont été enveloppés ensemble avec des serviettes de papier. Cette précaution a permis aux animaux de générer de la chaleur l'un pour l'autre et de diminuer leurs pertes de chaleur corporelle. Également, pour favoriser une hydratation et le remplacement du volume de sang prélevé, les rats ont reçu ~5 mL de Lactate de Ringer par voie sous-cutané immédiatement après le dernier prélèvement à chacune des séances.

Au jour 17, sous anesthésie et suivant les prises de sang, le ou les muscles traités et un muscle non-traité ont été prélevés, placés dans des tubes de polypropylène 1,5 mL, congelés immédiatement dans de la glace sèche (CO₂ (s)) et conservé à -70 °C.

Immédiatement après l'excision, les rats furent euthanasiés à l'aide d'une dose massive (65 mg/animal, intra-cardiaque) de pentobarbital sodique (Somnotol^{MC}, Bimeda-MTC Santé Animale Inc, Cambridge, Ont.).

3.4. ANALYSES

3.4.1. RIA

3.4.1.1. Ghrelin

Le dosage RIA ghrelin n'a pu être établi dans notre laboratoire. Toutefois, Dr Masayasu Kojima^a (18, 49, 50) a gracieusement dosé nos échantillons. Des aliquotes de milieux de cultures transfectées avec pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ lui ont été expédiées outremer sur glace sèche. Le dosage utilisé a été fait avec des anti-hGhrelin(1-11) Ser³-octanoylée, c'est-à-dire contre la partie N' terminale, *n*-octanoylée en Ser³.

3.4.1.2. GRF (humain)

Un protocole maison a permis le dosage du GRF dans les échantillons de plasma EDTA de souris et de milieux de culture suite à une validation accrue avec ces deux matrices. La validation consistait en une démonstration du parallélisme, du recouvrement et de l'interférence et ces démonstrations ont été répétées à trois reprises. Le traceur commercial ¹²⁵I-hGRF(1-44) (# cat. IM180, Amersham^{MC}, Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Buckinghamshire, England) était reconstitué dans le tampon RIA (décrit plus loin) aussitôt à son arrivé pour être conservé en aliquotes à -20 °C jusqu'à leur l'utilisation. Une courbe d'étalonnage pGRF (# cat G0769, Sigma Chemical) s'étendant de 3 à 3 000 pg/tube a été réalisée. Les limites de détection (ED80 et ED20) se situaient entre 21,7 ± 3,6 et

^a Masayasu Kojima, M.D., Ph.D., Department of Biochemistry, National Cardiovascular, Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan,

370,8 ± 63,3 pg/tube (ou 217 ± 36 et 3 708 ± 633 pg/mL). En résumé, 100 µL de standard ou d'échantillon, en triplicata ou duplicata respectivement, était incubé pour une période de 20 à 24 heures avec un anticorps primaire, sérum lapin anti-hGRF (dilution finale 1:600 000) (# cat RIN8061, anti-hGRF Peninsula, San Carlos, Ca, USA), et 100 µL du traceur (12 500 cpm/100 µL) dans un volume final de 500 µL ajusté avec un tampon RIA (tampon phosphate salin pH7.20, 0,1 % BSA : 0,15 M NaCl, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20 (Sigma), 0,1 % NaN₃, 0,1 % BSA (Sigma, RIA Grade)). Suite à une incubation de 16 à 20 heures, un précipité formé à l'aide de 50 µL d'un anticorps secondaire d'un sérum de chèvre anti-lapin (dilution 1:8 dans tampon RIA) (Cedarlane® Laboratories Ltd, Hornby, Ont. Canada provenant de Biogenesis, Poole, Angleterre) et de 50 µL de sérum normal de lapin (dilution 4 % dans tampon RIA) (Université de Montréal, Faculté de Médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Qc, Canada) était centrifugé à 3200 rpm (~2100x g) pendant 35 minutes à 4 °C (J-6M/E , Beckman), décanté et ensuite compté. Les comptes obtenus étaient corrigés pour l'activité non-spécifique (tampon RIA, trace et anticorps secondaire) et rapportés sur la liaison maximale corrigée (anticorps primaire, anticorps secondaire, tampon RIA et trace) puis ensuite comparés à la courbe d'étalonnage à l'aide du logiciel compris avec le compteur.

3.4.1.3. Somatotrophine de rat (rST)

Le protocole maison établi pour le RIA rST a servi à doser en duplicata des aliquotes de 5 µL d'échantillon de plasma EDTA de rat (section 3.3.2.3.2, page 52). Une validation a précédé les analyses et a consisté en une démonstration du parallélisme, du recouvrement et de l'interférence et ces démonstrations ont été répétées à trois reprises. La courbe

d'étalonnage qui a servi de référence s'étendait de 0,05 à 12,8 ng/tube et les limites de détection (ED80 et ED20) s'étendaient de $0,136 \pm 0,025$ à $2,425 \pm 0,465$ ng/tube (rGH, GH-RP-2, A.F. Parlow, NHPP, Torrance, CA, USA). Brièvement, 100 μ L d'échantillon ou de standard était incubé pour une période de 20 à 24 heures avec 100 μ L d'un sérum singe anti-rST (dilution finale 1:1 600 000) (anti-rGH-S-5 A.S., A.F. Parlow, NHPP, Torrance, CA, USA) et 100 μ L du traceur marqué maison (section 3.4.1.3.1, page 57) dans volume final de 500 μ L ajusté avec un tampon RIA (tampon phosphate salin pH7.20, 1,0 % BSA : 0,15 M NaCl, 10 mM EDTA, 0,1 % NaN_3 , 1,0 % BSA (Sigma, RIA Grade)). Suite à une incubation de 16 à 20 heures, un précipité formé à l'aide de 50 μ L d'un sérum de chèvre anti-singe (dilution 1:10 dans tampon RIA) (Cedarlane[®] Laboratories Ltd, Hornby, Ont. Canada) et de 50 μ L d'un sérum normal de singe (dilution 4 % dans tampon RIA) (Santé Canada, Ottawa, Ontario, Canada) était centrifugé à 3200 rpm (~2100x g) pendant 35 minutes à 4 °C (J-6M/E, Beckman), décanté et ensuite compté. Les comptes obtenus étaient corrigés pour l'activité non-spécifique (tampon RIA, trace et anticorps secondaire) et rapportés sur la liaison maximale corrigée (anticorps primaire, anticorps secondaire, tampon RIA et trace) puis ensuite comparés à la courbe d'étalonnage.

3.4.1.3.1. Préparation du traceur ; marquage de la rST avec ¹²⁵I

Un protocole maison bien détaillé a été établi pour le marquage de 5 μ g de rST (rGH-I-6, IOD, A.F. Parlow, NHPP, Torrance, CA, USA) avec 0,5 mCi d'¹²⁵I (Amersham^{MC}, Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd, Buckinghamshire, Angleterre) par oxydation dans un tube de borosilicate 12x75 mm dont le fond est couvert d'un film (phase solide) de 1,25 μ g d'Iodo-Gen[®] (# cat 28600, Pierce Chemical, Rockford, Ill, USA). La réaction (83)

d'oxydation vise à oxyder l'iode I^- (iodide) à un état de valence supérieur, I^+ . Ce dernier ion (iodeux) peut ensuite former une attaque nucléophile en position *ortho* du groupe aromatique d'une tyrosine, lorsque réalisé à un pH~7, ou attaquer le groupe imidazole de l'histidine si la réaction est produite à un pH>9. L'oxydation est tenue dans un volume de 100 μ L (tampon 0,1 M phosphate) pendant 5 minutes sur glace, terminée par le transfert du volume réactionnel à un nouveau tube sans Iodo-Gen[®] et incubée sur glace pour 15 à 20 minutes. Par la suite, des fractions de dix gouttes ont permis de séparer la protéine marquée de l'iode libre sur une colonne de gel de Séphadex[®] G-25 M (Pharmacia Biotech) et 5 μ L des fractions a été compté sur le compteur γ pour en identifier les pics d'élution. Seule cette fraction du premier pic radioactif (se situe vers la 6^{ième} fraction) correspondant au pic de la rST a été diluée dans le tampon RIA et conservée. Le traceur radioactif a été entreposé pour un maximum de quatre à six semaines, en aliquotes dans des tubes de polypropylène de 1,5 mL, à -20 °C et reconstitué au besoin à environ 12 500 cpm / 100 μ L.

3.4.1.4. Comptage des échantillons RIA

Après décantation, les culots ont été comptés en série sur un compteur gamma (Isomedic 10/600, ICN). Les cpm de chaque échantillon (B) de même que la liaison maximale (B_0) (anticorps primaire, tampon RIA, trace et anticorps secondaire) étaient corrigés pour la liaison non spécifique (NSB) (tampon RIA, trace et anticorps secondaire). Le ratio exprimé en pourcentage (%) de liaison en relation avec la liaison maximale était alors calculé pour chacun des échantillons et des références. La concentration des échantillons était alors estimée en relation avec la courbe d'étalonnage et exprimée en

ng/mL ou pg/mL. Cette relation était calculée par un logiciel compris dans le compteur gamma.

3.4.2. RT-ACP

L'expression en ARNm des transgènes ghreline et GRF porcins dans les tissus transfectés était évaluée par RT-ACP. Dans tous les tissus d'intérêt, le poumon, le muscle (traité ou non selon les cas) ou le foie ont été homogénéisés en entier et l'ARNtot en a été extrait et analysé (décrits en 3.2.1.2, page 29). Avant de procéder à la synthèse d'une banque d'ADNc (ou génothèque complémentaire) (section 3.2.1.3, page 30), l'ARNtot a subi deux traitements consécutifs à la DNase I. Deux ACP (section 3.2.1.4, page 30) en parallèle ont été pratiquées à la fois sur les ARNtot et les ADNc correspondants. L'ACP sur l'ARNtot a servi de témoin pour en vérifier la contamination en ADN génomique ou plasmidique. Un gel à 1,5 % d'agarose (décrit en 3.2.3.3, page 38) a permis de visualiser les résultats d'expression des fragments de ~400 et 225 pb.

3.4.2.1. ADNc du pGRF

Les amorces qui ont servi à amplifier durant 35 cycles à une température d'anneau de 52 °C sont les suivantes : sens 5'-AGGATGCCACTCTGGGTGTTCTTCC-3' et antisens 5'-CTAGACTCGAGCGCTAAAGCCGTACC-3'.

3.4.2.2. ADNc de la ghreline et de la ghreline Δ Q¹⁴ porcines

Les amorces sens et antisens, dont les séquences sont 5'-AGGAAGACCAGCTGAGGCCATGC-3' (amorce #2, figure 2, page 32) et 5'-AGGTGGCTGGTCTCAGGGACAA-TCA-3' (amorce #11, figure 2) respectivement, ont été utilisées dans l'amplification de la

ghreline porcine. Les paramètres d'amplification étaient les suivants : température d'annelage à 52 °C durant 35 cycles.

3.5. ANALYSES STATISTIQUES

Le logiciel informatique SAS (version 8.01 pour Windows®) a été utilisé pour toutes les analyses statistiques. Les valeurs de $p < 0,05$ étaient considérées comme significatives pour les tests de t (Student), de même qu'avec les tests de Tukey et Dunnett selon un modèle général linéaire (MGL) pour les données répétées. On considérait l'analyse par MGL pour toutes les données répétées, c'est-à-dire les données se rattachant à un individu dont une variable était analysée à plusieurs reprises dans le temps. Aussi, pour les analyses à données répétées demandant une analyse par MGL, l'individu était pris en considération comme faisant parti d'un groupe de traitement, si tel était le cas.

4. RÉSULTATS

4.1. CLONAGE DE L'ADNC DE LA GHRELINE ET DE LA GHRELINE DÉS-GLN¹⁴ PORCINES

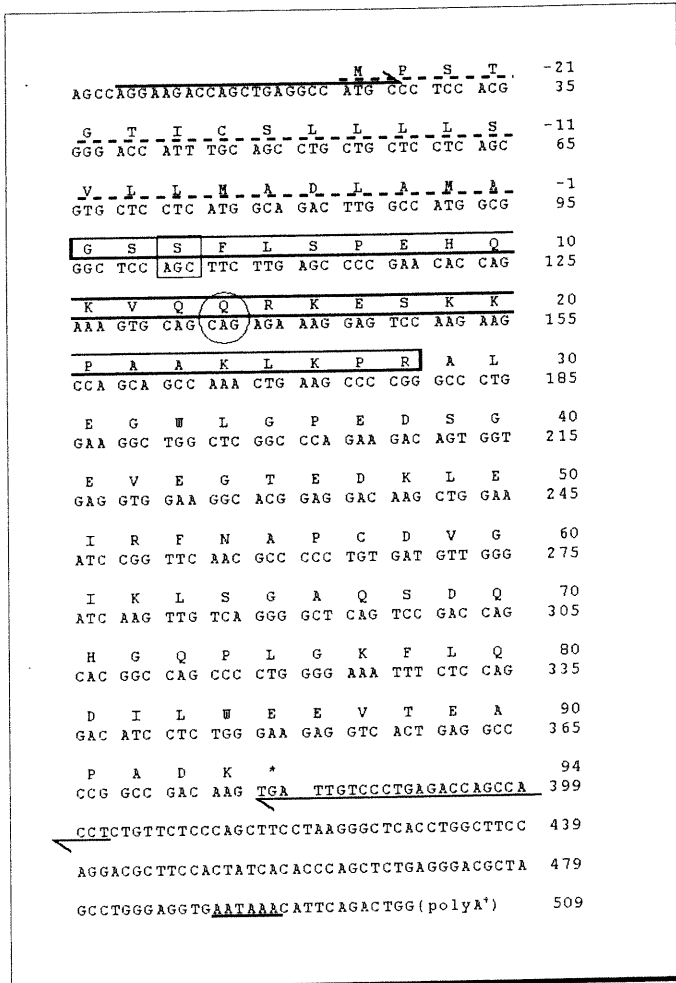


figure 5 : Séquence complète de l'ADNC de la préproghreline porcine. Le codon de la Glu¹⁴, absent dans l'une des séquences d'ADNC, est encadré. Le codon de la Ser³ est encadré pour montrer la position probable de l'acylation sur la Ser³. Les flèches indiquent les positions, les sens et les séquences des amorces ayant servi à l'amplification pour incorporation dans pCMV. Le peptide signal est souligné en tirets et le signal de queue de polyA⁺ est souligné en continu. L'étoile indique le codon stop.

Deux séquences d'ADNC de la ghreline porcine ont été isolées à partir d'extrait d'ARNtot de la région pylorique d'estomac de porc, l'une de 506 pb et l'autre de 509 pb. Les séquences ont été soumises pour publication dans GenBank^{MC} a sous les numéros d'accèsion AF308930 (préproghreline porcine(1-28)) et AY028942 (préproghreline porcine(1-27) dés-Gln¹⁴). La figure 5 montre les séquences déduites et rassemblées d'après celles obtenues avec les 3'RACE et 5'RACE se chevauchant. Le codon de la Gln¹⁴, qui est signalé dans la figure par un cercle, est absent

^a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>

dans la séquence de 506 pb. De même, le codon de la Ser³ y est encadré pour démontrer le site probable d'acylation du peptide porcine selon l'homologie avec les autres espèces. Également, la séquence de la ghreline, de la préproghreline, de la proghreline, du signal de la queue de polyadénylation et la séquence amplifiée et incorporée dans les constructions (décrit ci-après) y sont toutes illustrées.

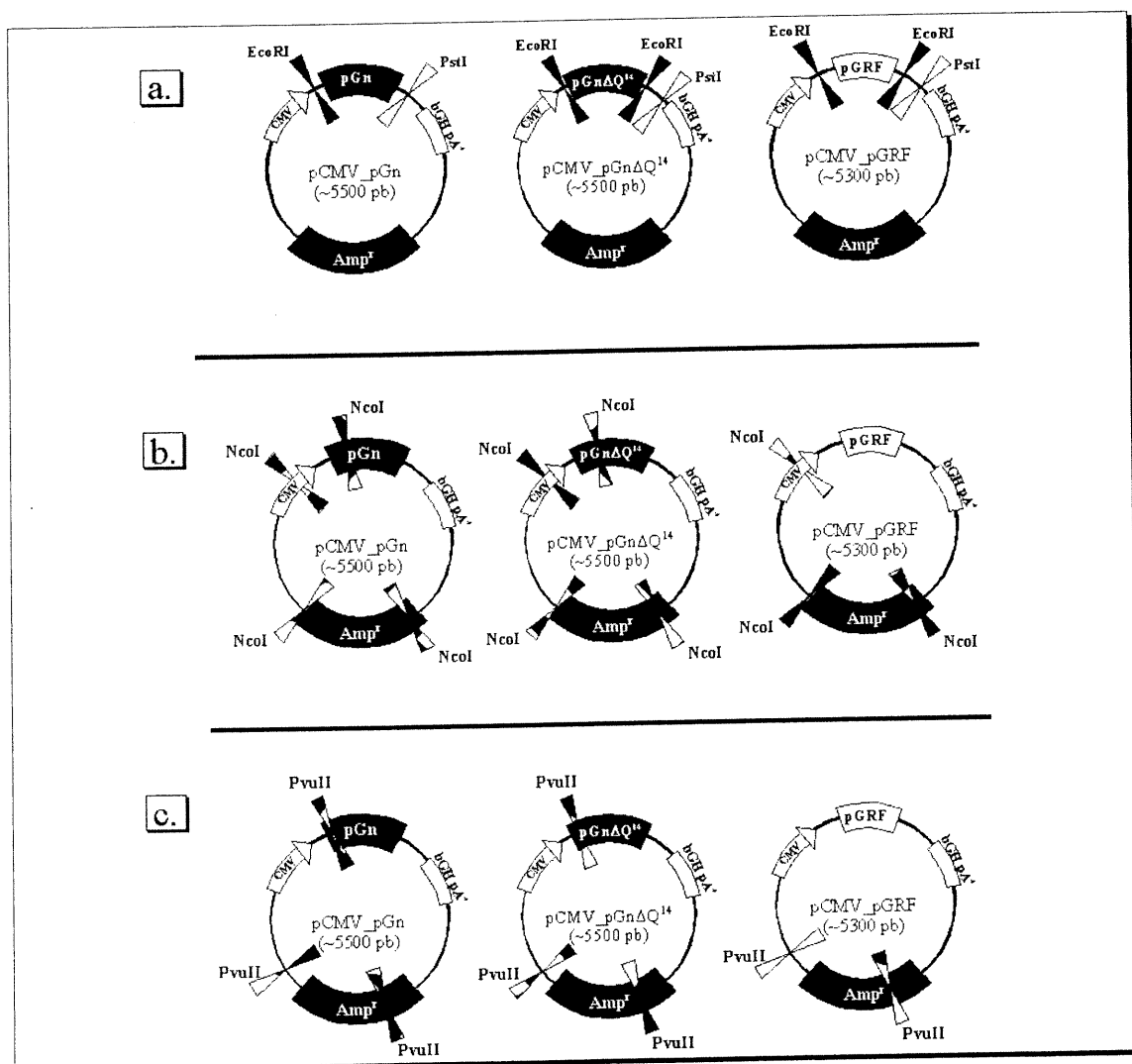


figure 6 : Représentation de l'agencement des séquences dans les vecteurs plasmidiques pCMV contenant les ADNc pGhrelin, pGhrelin Δ Q¹⁴ et pGRF. On y compare les positions relatives des sites des endonucléases de restriction qui ont servi à la caractérisation des plasmides : en (a) EcoRI et PstI, en (b) NcoI, en (c) PvuII. «Gn» est l'abrégié qui se rapporte à ghreline, e.g. pGn = pGhreline ; «bGHpA⁺» est la séquence du signal de polyadénylation de la ST bovine ; «Amp^r», est la séquence codant pour le gène de résistance à l'ampicilline nécessaire pour la sélectivité lors de l'amplification plasmidique ; «CMV» est la séquence du promoteur du cytomégalovirus.

La figure 6 (page 62) présente l'agencement des deux constructions plasmidiques obtenus avec les ADNc de la ghreline porcine ainsi que le plasmide pCMV_pGRF acquis d'un projet antérieur. Les deux séquences d'ADNc de la ghreline ont été incorporées dans pCMV. Suite à un séquençage, au hasard, de quatre clones de ghreline porcine dans pGEM[®]-T Easy, une seule séquence n'affichait pas de Gln¹⁴. Ainsi, sur un échantillon restreint, nous avons obtenu le ratio 1:3 pour les ADNc de la ghrelin(1-27) par rapport à la ghreline(1-28). L'incorporation des deux variantes d'ADNc de pGhrelin et pGhrelin Δ Q¹⁴ dans pCMV s'est faite par des processus divergents dans le but d'obtenir deux constructions distinctes. Ainsi, il est possible de différencier les deux constructions de la ghreline par le site EcoRI en 3', qui est présent dans pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴, mais qui est absent dans le plasmide pCMV_pGhrelin. Aussi, les sites de restrictions d'endonucléases NcoI et PvuII permettent de distinguer les plasmides pCMV_pGRF et pGEM[®]-T Easy_(pGhrelin) des plasmides pCMV_(pGhrelin).

Les séquences préproghreline des deux clones pCMV_pGhrelin et pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ sont toutefois légèrement différentes l'une de l'autre. En référence à la séquence de la figure 5 (page 61), dans le plasmide pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴, les nucléotides 73 et 237 sont apparus différents [le nt 73 : une thymidine (T) est substituée par une cytidine (C) et le nt 237 : une adénosine (A) est substituée par une guanosine (G)] et cela a comme incidence de modifier la séquence protéique de la préproghreline dés-Q¹⁴ : l'acide aminé -8 est une proline (P) plutôt qu'une leucine (L) et l'acide aminé 48 est un glutamate (E) à la place d'une lysine (K). Aussi, toujours en référence à la séquence affichée à la figure 5 (page 61) dans le plasmide pCMV_pGhrelin, le nucléotide 184, une T, est substitué par une C et engendre donc un codon faisant la lecture d'une proline (P) en

position 30 plutôt que d'une leucine (L). Ces séquences altérées ne touchent aucunement les séquences nucléiques et protéiques de la ghreline porcine 1-27 et 1-28, mais plutôt les séquences de la préghreline et de la proghreline.

Les deux giga-préparations d'ADN plasmidique de pCMV_pGRF et de pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ ont permis de récolter >28 mg ($A_{260/280} > 1,8$) de chacun des plasmides. Aucune vérification n'a été faite sur la présence d'endotoxines dans ces préparations.

Il était prévu que les deux plasmides allaient être utilisés et comparés dans des transfections *in vitro* et *in vivo* afin d'analyser de façon moléculaire et physiologique les deux formes de ghreline. Puisque la première construction à être fabriquée et confirmée par séquençage a été pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴, nous avons débuté par faire une giga-préparation de celle-ci pour ensuite faire le deuxième, pCMV_pGhrelin. Puisque la giga-préparation de pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ a été fabriquée en premier, nous avons lancé les transfections *in vitro* et *in vivo* de façon préliminaire avec ce plasmide.

4.2. TRANSFECTION *IN VITRO*

La première étape de transfection avec les giga préparations des plasmides pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ et pCMV_pGRF s'est déroulée *in vitro*.

La figure 7 (page 65) démontre les différentes concentrations de pGRF dans les milieux d'incubation entre les cellules eucaryotes non-transfectées et transfectées, effectué *in vitro* avec pCMV_pGRF. Les concentrations de pGRF immunoréactif du milieu de culture des cellules transfectées étaient de $947 \pm 51,5$; $1251 \pm 41,1$ et $1309 \pm 87,3$ pg/mL (moyenne \pm SEM). Ces concentrations étaient significativement différentes ($p < 0,001$) des

niveaux de pGRF présents dans les milieux de cultures témoins ($137 \pm 9,34$; $135 \pm 8,61$ et $132 \pm 18,6$ pg/mL (moyenne \pm SEM)). En référence, le plus bas étalon de la courbe était à 30 pg/mL et la limite inférieure de détection (ED80) était située à 217 ± 36 pg/mL tandis que la limite supérieure (ED20) était à 3708 ± 633 pg/mL. Des RT-ACP n'ont pas été effectuées sur ces transfections.

La seconde évaluation de transfection *in vitro* s'est réalisée avec

pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ sur des cellules adréncarcinomiales murines. Le dosage de ghreline Ser³-octanoylée immunoréactive a résulté respectivement en des valeurs de $446,6 \pm 40,0$ pg/mL et $487,0 \pm 5,4$ pg/mL pour le milieu de culture de cellules non transfectées (n=3) et transfectées (n=3). Ces niveaux de ghreline n'étaient pas significativement différents l'un de l'autre, où la valeur de $p=0,37$ du (test de *t* Student). Le dosage utilisé a été fait avec des anti-hGhrelin(1-11) Ser³-octanoylée, c'est-à-dire contre la partie N' terminale, *n*-octanoylée en Ser³. Fait à noter, les séquences de la hGhrelin(1-11) et de la pGhrelin(1-11) ne sont différentes que pour le onzième acide aminé (voir figure 11, dans la section Discussion, page 77).

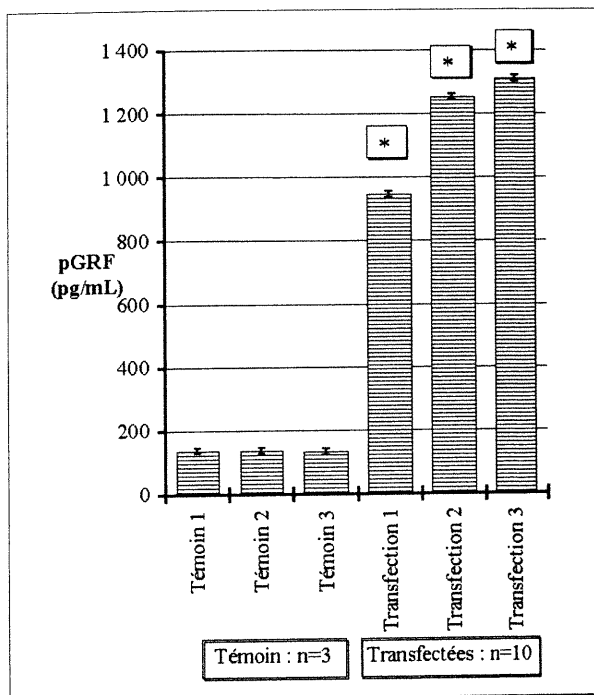


figure 7 : Concentrations de pGRF immunoréactif présent dans les milieux de cultures cellulaires eucaryotes suite à des transfections *in vitro* avec pCMV pGRF.
* = $p < 0,001$ par rapport au témoin ; moyenne \pm SEM pour chacune des valeurs.

Des RT-ACP effectuées sur ces cellules murines non-transfectées et transfectées avec pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ n'ont pas pu démontrer hors de tout doute qu'il y avait expression sous forme d'ARNm de la préproghreléine porcine. La figure 10 (page 75) donne un exemple de résultats obtenus. Malgré les étapes d'ADNase, l'expression recherchée était entachée par le produit d'amplification issu de l'ADN plasmidique, comme l'a démontré l'ACP exercée sur les ARNtot, sans RT. Ces manipulations ont été répétées à plusieurs reprises, dans différents laboratoires et par différents expérimentateurs afin d'obtenir une analyse complète et détaillée. Malheureusement, aucune n'a mené à des résultats satisfaisants, exclusivement et entièrement exempts de produits plasmidiques et/ou de contamination plasmidiques. Il est possible de percevoir dans cette figure une certaine contamination des témoins (eau) - cette figure n'est que représentative ; d'autres essais étaient exempts de contaminant dans l'eau mais n'était pas représentative pour le reste.

4.3. TRANSFECTION *IN VIVO*

4.3.1. EXPÉRIENCE I : ÉVALUATION DE LA TRANSFECTION CHEZ LA SOURIS AVEC DEL'ADN NU DE pCMV_pGRF OU AVEC pCMV_pGRF AVEC SPERMIDINE

Les résultats de transfections intramusculaires chez la souris avec le pCMV_pGRF nu ou avec le dispositif d'administration spermidine sont présentés dans le tableau I (page 67).

Les concentrations de pGRF chez les souris traitées n'ont pas été significativement différentes ($p > 0,05$) de celle du groupe témoin. Malgré qu'elle ait été non significative, une

tableau I : Concentrations de pGRF plasmatique et poids des souris transfectées par voie i.m. avec pCMV_pGRF ± spermidine au jour 7 suivant les traitements

Groupe	GRF (pg/mL)			Poids (g)		
	Moyenne	sem	valeur de p test de t (Student)	Moyenne	sem	valeur de p test de t (Student)
Témoin (n=5)	510,6	139,87	-	25,8	0,44	-
20 µg pCMV_pGRF (n=4)	534,0	196,74	0,92	21,6	1,97	0,053
100 µg pCMV_pGRF (n=4)	521,8	230,20	0,97	23,1	0,51	0,005
20 µg pCMV_pGRF + spermidine (n=4)	162,0	56,36	0,074	22,4	2,13	0,13
100 µg pCMV_pGRF + spermidine (n=4)	317,0	65,74	0,29	23,6	1,20	0,099

diminution ($p=0,074$ et $0,29$) de pGRF a été perceptible avec l'utilisation de spermidine, sans avoir eu d'effet significatif sur les poids une semaine après le traitement.

Malgré tout, une semaine après le traitement, on a observé une perte de poids chez tous les groupes traités par rapport au témoin. Cette différence de poids était significative ($p<0,05$) pour le groupe qui a reçu 100 µg de pCMV_pGRF sans spermidine ($p=0,005$), toujours comparativement au témoin. Le poids de chacun des groupes traités n'ont toutefois pas été différents entre eux.

Par la suite, il a été tenté de définir l'expression en ARNm issue de pCMV_pGRF. Ainsi, des RT-ACP retrouvées à la figure 10 (page 75), ont été exercées sur les muscles traités et non traités. Ces RT-ACP n'ont pas mené à des conclusions sur l'expression, puisque la présence de produits d'amplification issus de l'ADN plasmidique invalidait les résultats positifs. Cette contamination issue de l'ADN plasmidique est confirmée par l'ACP exercée sur l'ARNtot sans RT.

4.3.2. EXPÉRIENCE II : EXPLORATION DE TROIS VOIES D'ADMINISTRATION POUR LA TRANSFECTION CHEZ LA SOURIS AVEC DE L'ADN NU DE pCMV_pGRF OU AVEC pCMV_pGRF AVEC DOTAP

Les résultats à la figure 8 (page 69) présente la deuxième série d'essais. Des transfections répétées chez la souris en croissance avec pCMV_pGRF ont été effectuées au jour 0, 7 et 14, pour tester cette fois-ci d'autres modes d'administrations. Les trois modes d'administration choisis ciblaient la transfection de divers tissus : (1) le groupe i.m. ciblait la transfection du muscle gastrophémien ; (2) le groupe i.v./HD ciblait le foie, et (3) le groupe i.v. ciblait le premier réseau de capillaires à partir de la veine de la queue, soit le poumon.

Les concentrations de pGRF dans le plasma des souris après 21 jours n'étaient pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre le groupe témoin et chacun des groupes traités. Or, le suivi du poids des souris comme indice de la croissance a permis de déceler des différences. En général, ces différences sont ressorties des groupes recevant une dose de 900 nmol de DOTAP qui a causé une tendance à un retard de croissance. Les animaux du groupe f (traitement i.v. avec DOTAP) étaient significativement ($p < 0,05$) plus légers aux jours 10, 12 et 14, ce, comparativement aux trois groupes traités ne recevant pas de DOTAP. Aussi, la différence de poids était significative ($p < 0,05$) pour ce même groupe par rapport au groupe témoin pour les jours 10 et 12 et aussi pour toute la période de 21 jours.

Également, afin de tenter de définir la présence d'expression en ARNm issue de pCMV_pGRF, des RT-ACP retrouvées à la figure 10 (page 75) ont été exercées sur les muscles et poumons de souris traitées et non traitées. Ces RT-ACP n'ont pas mené à des conclusions sur l'expression étant donné la présence de produit d'amplification issu de

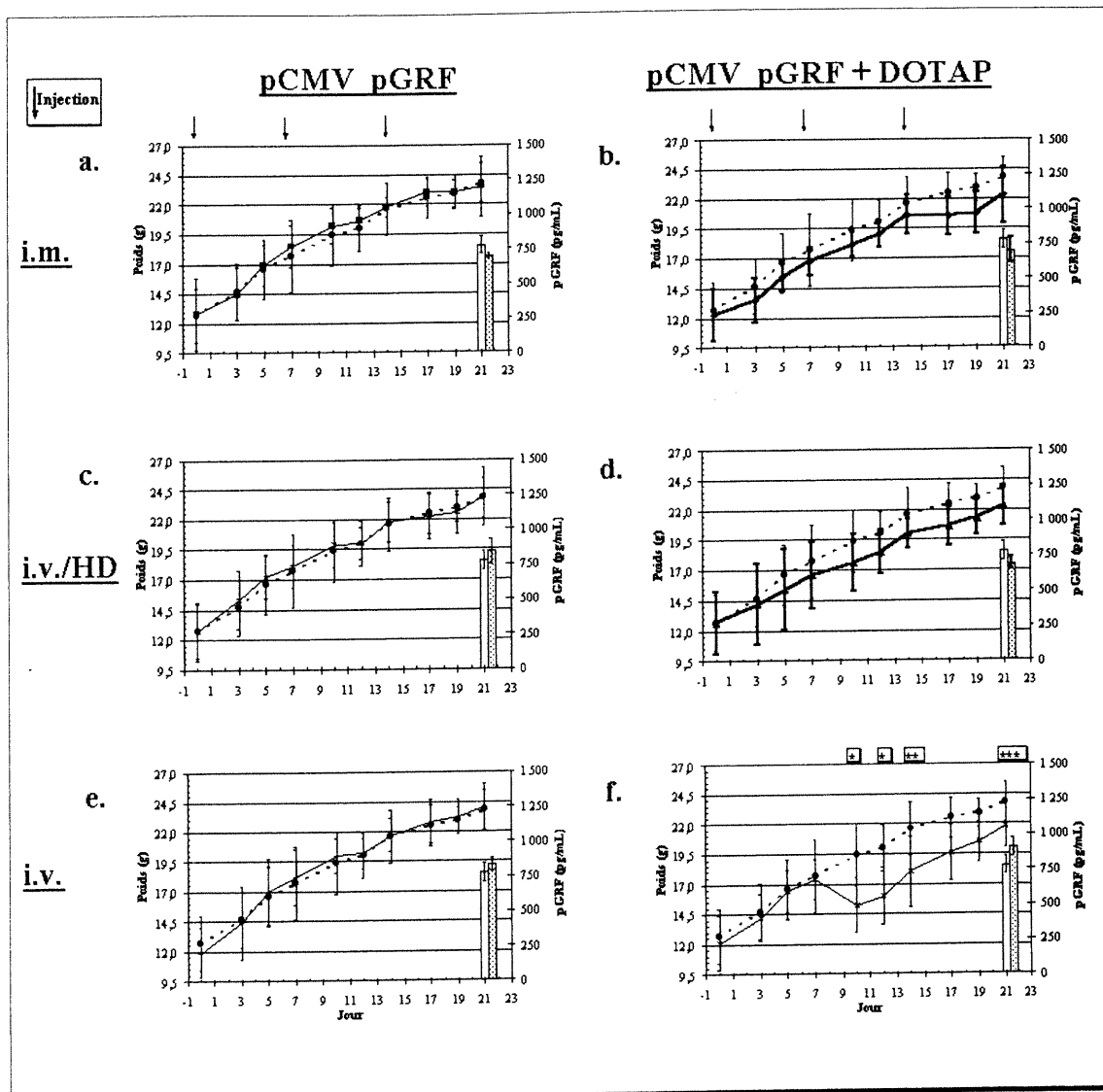


figure 8 : Suivi de la croissance pendant 21 jours et niveau de pGRF immunoréactif plasmatique au jour 21 suite à une transfection *in vivo* avec pCMV pGRF chez la souris mâle en croissance. La transfection a été faite selon trois modes d'administration : intramusculaire (i.m.), intraveineux par hydrodynamisme (i.v./HD) et intraveineux (i.v.) . Les courbes correspondent aux poids et les histogrammes correspondent aux niveaux de pGRF, où moyenne \pm écart type. Les tirets, la colonne vide et les barres d'erreur minces correspondent au même groupe témoin et les groupes traités sont illustrés par la ligne continue, la colonne pleine et les barres d'erreurs grasses. Chaque graphe correspond à un traitement où il est comparé au groupe témoin unique. À gauche sont indiqués les modes d'administration et au-dessus sont indiqués les dispositifs d'administration. Les valeurs de p pour les différences de poids ont été calculées selon un modèle général linéaire statistique : * correspond à $p < 0,05$ aux jours 10 et 12 pour le groupe (f) par rapport au groupe témoin, (a), (c) et (e) ; ** correspond à $p < 0,05$ au jour 14 pour le groupe (f) par rapport aux groupes (a), (c) et (e) ; *** correspond à $p < 0,01$ pour le groupe (f) par rapport au groupe témoin pour toute la période de suivi de 21 jours. Les valeurs de p pour les différences de pGRF ont été calculées selon un test de t (Student) : tous les $p > 0,20$, $n = 5$ /groupe dans tous les cas sauf le groupe (b) (i.m. DOTAP) où $n = 4$ après le jour 2.

l'ADN plasmidique. Cette contamination d'ADN plasmidique est confirmée par l'ACP exercée sur l'ARNtot sans RT, malgré une digestion par ADNase suivant l'isolement de l'ARNtot.

4.3.3. EXPÉRIENCE III : ÉVALUATION DE L'ÉLECTROTRANSFERT GÉNIQUE (GET) CHEZ LE RAT AVEC DE L'ADN NU DE pCMV_pGRF ET / OU pCMV_pGHRELIN Δ Q¹⁴

La troisième série d'évaluation a porté sur un autre mode d'administration, soit le transfert génique par électrostimulation ou GET, afin d'explorer une autre méthode *in vivo* qui pourrait permettre la transfection et l'expression de plasmide arborant les ADNc des peptides ghreline et GRF porcins sous le promoteur CMV. Nous avons limité les observations aux effets du GRF et/ou de la ghreline sur les concentrations de rST uniquement. Ainsi, des rats adultes (~135 jours), mâles et femelles, ont été transfectés avec pCMV_pGRF ou pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ seul ou en combinaison, selon un dispositif expérimental de carré latin 2x2.

Au cours de l'étude, plusieurs rats ont été retirés pour diverses raisons. Au jour 3, des complications ont forcé l'euthanasie de deux rats mâles du groupe témoin et de deux rats mâles du groupe D pour cause de cystite aiguë, peut-être due à une obstruction urinaire, hypothétiquement associée à l'électroporation qui aurait causé la libération d'un bouchon muqueux au niveau vésical. Entre le jour 3 et le jour 13, huit rats sont morts, dont les seuls événements communs pouvant expliquer leur décès, étant les anesthésies et les prises de sang répétées. Malgré les attentions portées et les dispositions mises de l'avant, l'anesthésie aux barbituriques peut provoquer une hypothermie et/ou un arrêt respiratoire. Aucune

corrélation n'a pu être estimée au sein de ces pertes animales par rapport aux traitements, aux sexes, au poids ou à l'état de chair de ces animaux.

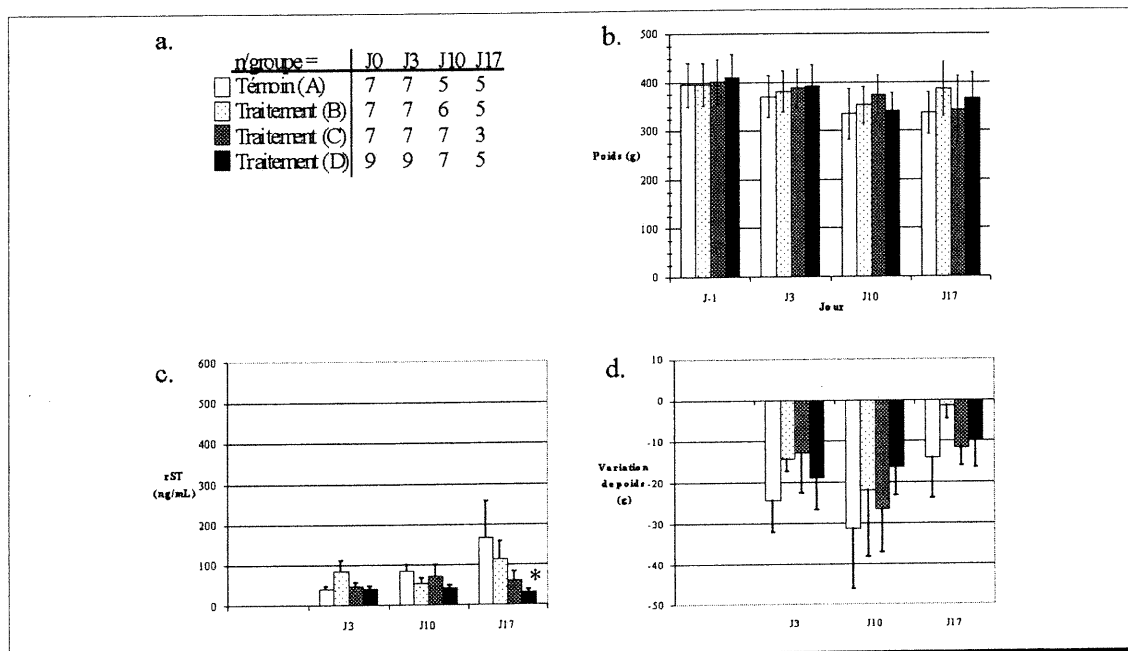


figure 9 : Profil de somatotrophine et suivi du poids chez le rat adulte mâle et femelle suite à une électrotransfection génique (GET) *in vivo* avec pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ et/ou pCMV_pGRF. Moyenne \pm SEM. (a) la légende indique le nombre de rats par groupe à chacun des jours de suivi : groupe A Témoin, groupe B 1 mg/kg de pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴, groupe C 2 mg/kg de pCMV_pGRF et groupe D 1 mg/kg de pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ + 2 mg/kg de pCMV_pGRF ; (b) poids des rats ; (c) pour un traitement et un jour de prélèvement donnés, les niveaux de rST sont le résultat de la moyenne des moyennes individuelles d'un profil d'une heure ; * significativement inférieur au témoin ($p < 0,05$) et (d) variation du poids des rats en fonction du jour -1.

La figure 9 et les tableaux II et III (page 72) présentent les résultats obtenus suite aux quatre traitements administrés. Une baisse non significative ($p > 0,05$) de poids suite aux traitements est notée dans les animaux de chacun des quatre groupes. Par la suite, une reprise de la perte de poids non significative semble présente chez les trois groupes traités (figure 9d) et plus particulièrement chez le groupe B traité avec la ghreline seule. Toutefois, l'analyse statistique des poids révèle qu'une seule différence significative ($p < 0,05$), c'est-à-

tableau II : Poids des rats électrotransfectés (GET) avec pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ ou pCMV_pGRF, seul ou en combinaison sur une période de 17 jours. Moyenne \pm SEM (voir figure 9 (a) pour valeurs de n).

rats	poids (g)			
	J-1	J3	J10	J17
Témoin (A)	395,0 \pm 45,58	370,7 \pm 43,32	335,0 \pm 51,73	337,0 \pm 42,50
Traitement (B) 1 mg/kg pCMV_pGhrelin	395,7 \pm 43,74	381,4 \pm 42,75	352,2 \pm 37,42	386,6 \pm 55,94
Traitement (C) 2 mg/kg pCMV_pGRF	400,7 \pm 45,70	387,9 \pm 39,37	374,3 \pm 40,50	343,3 \pm 68,39
Traitement (D) 1 mg/kg pCMV_pGhrelin + 2 mg/kg pCMV_pGRF	411,1 \pm 47,86	392,2 \pm 43,04	341,0 \pm 36,07	366,4 \pm 52,80

dire que les groupes ont réagi différemment aux traitements en fonction du temps. Ceci est attribuable au nombre d'animaux qui a différé tout au long de l'expérience (figure 9a, page 71). Même en ignorant les animaux qui n'ont pas terminé le suivi dans l'analyse, aucune différence significative n'est décelée (données non montrées).

Quoique non significative, ($p > 0,49$), les concentrations plasmatiques de rST pour chacun des groupes à une journée de prélèvement donnée sont la moyenne des trois

tableau III : Concentrations plasmatiques de somatotrophine (rST) chez des rats électrotransfectés (GET) avec pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ ou pCMV_pGRF, seul ou en combinaison. Moyenne \pm SEM (voir figure 9 en (a) pour le nombre d'animaux par groupe).

rats	rST (ng/mL)		
	J3	J10	J17
Témoin (A)	44,4 \pm 9,29	84,8 \pm 21,67	142,7 \pm 66,75
Traitement (B) 1 mg/kg pCMV_pGhrelin	81,6 \pm 34,82	52,1 \pm 12,43	104,7 \pm 60,45
Traitement (C) 2 mg/kg pCMV_pGRF	45,8 \pm 8,50	108,6 \pm 58,32	61,3 \pm 31,21
Traitement (D) 1 mg/kg pCMV_pGhrelin + 2 mg/kg pCMV_pGRF	38,1 \pm 5,84	48,9 \pm 13,54	35,1 \pm 8,90

prélèvements réalisées lors du profil d'une heure. Ce profil d'une heure a été réalisé afin de diminuer la variation des concentrations de rST. Aucune différence significative des niveaux de rST n'a pu être observé entre les groupes à chacun des jours à l'exception du jour 17 où de plus hautes concentrations de rST ont été observées ($p < 0,05$) chez les animaux témoins (tableau III et figure 9).

À la fin de l'expérimentation, la vérification de l'expression de la somatocrinine ou de la ghreline porcine issue de pCMV_pGRF et pCMV_pGhrelin ΔQ^{14} par RT-ACP a été réalisée (figure 10, page 75). Chez plusieurs rats témoins ou transfectés, les RT-ACP ont été exercées sur les muscles traités et non traités d'un même rat. De nombreuses RT-ACP ont été accomplies, mais elles étaient toutes contaminées par des produits d'amplification issus de plasmides. Or, une seule des réactions tentées est affichée à la figure 10 (page 75). Celle-ci montre les réactions d'amplifications pour la ghreline et le GRF sur les muscles traités et non traités d'un seul rat du groupe D (pCMV_pGRF et pCMV_pGhrelin ΔQ^{14}). Toutefois, ces RT-ACP n'ont pas mené à des conclusions claires sur l'expression, car elles sont, également, entachées par des produits d'amplification issus des ADN plasmidiques, malgré les étapes répétées de digestion par ADNase.

La contamination en ADN plasmidique est confirmée par l'ACP exercée sur l'ARNtot sans RT. Ces manipulations ont été répétées à plusieurs reprises, dans différents laboratoires et par différents expérimentateurs afin d'obtenir une analyse complète et détaillée. Malheureusement, aucune n'a mené à des résultats satisfaisants, exclusivement et entièrement exempts de produits plasmidiques et/ou de contamination plasmidiques. Il est possible de percevoir dans cette figure une certaine contamination des témoins (eau) - cette figure n'est que représentative mais elle a été choisie puisque d'autres essais étaient

exempts de contaminant dans l'eau mais n'était pas représentatifs pour le reste de l'analyse. Il est à noter aussi que dans cet exemple de la figure 10, les témoins négatifs (eau) sont contaminés dans le cas de l'ACP mais ne ressortent pas contaminés dans la RT-ACP, ce qui explique que l'ordre dans laquelle les analyses ont été conduites a une importance dans la contamination des contrôles.

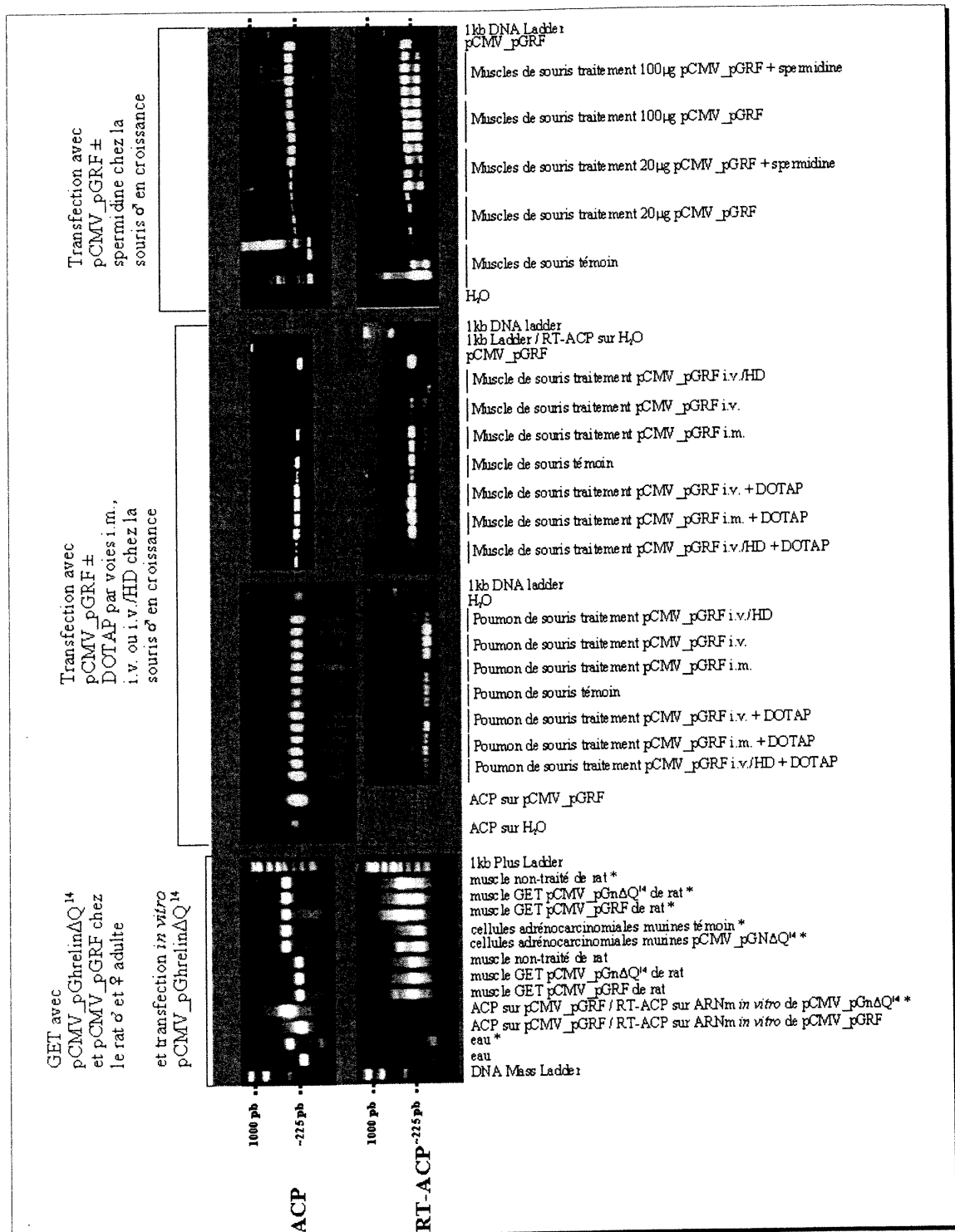


figure 10 : Exemples de RT-ACP et ACP contrôles pouvant démontrer l'expression d'ARNm de pGRF après transfection *in vivo* et de la pGhrelin après transfection *in vitro* et *in vivo*. Toutes ces RT-ACP et ACP ont été faites avec des amorces spécifiques à l'ADNc du pGRF (fragment de ~ 225 pb) et l'étoile (*) indique les réactions qui ont utilisé les amorces spécifiques à la pGhrelin (fragment de ~ 400 pb). Plusieurs réactions de ce genre ont été réalisées par deux expérimentateur(trice) distincts, dans des laboratoires séparés avec des stocks différents, donnant somme toute des résultats semblables. Se référer au texte pour une description complète des résultats.

5. DISCUSSION

5.1. ISOLEMENT DE L'ADNC DE LA GHRELINÉ PORCINE

Cette étude rapporte pour la première fois l'isolement et la caractérisation de l'ADNc de la ghreliné et de la ghreliné ΔQ^{14} chez l'espèce porcine. Il est apparu évident dès le premier séquençage que deux variantes d'ADNc de la ghreliné porcine avait été obtenues à partir d'amorces spécifiques à la séquence nucléique de la ghreliné humaine. Il s'y produisait un brouillage de lecture de séquençage à partir du codon correspondant à la glutamine en position 14 de la ghreliné humaine et de rat et ce indépendamment du sens de lecture. Il a été démontré par Hosoda et coll. (50) que la ghreliné humaine et de rat existait aussi sous une autre forme, c'est-à-dire identique à la première, à l'exception qu'elle était raccourcie à la position de la glutamine 14 (Gln¹⁴). Ce même phénomène s'appliquant également à la ghreliné de l'espèce porcine a nécessité que l'on procède à l'insertion de tous produits d'ACP dans un vecteur universel de clonage afin d'obtenir la lecture d'une seule variante d'ADNc à la fois. Il est expliqué que les deux formes seraient transcrites à partir d'un seul et unique gène (50). Ce dimorphisme de la ghreliné est décrit par le fait qu'il existe un intron de 536 paires de bases se terminant par les acides nucléiques CAG CAG entre les codons 13 et 14. L'épissage alternatif utiliserait alors l'un ou l'autre des dinucléotides AG pour reprendre le cadre de lecture, donnant naissance à la ghreliné(1-28) si le premier est préféré et à la ghreliné ΔQ^{14} (1-27) si le second est utilisé. Le premier AG semblerait être préféré puisque que la concentration de la ghreliné(1-28) est environ quatre fois plus élevée que celle de la ghreliné ΔQ^{14} (50). Nous avons également atteint, suite à un séquençage non exhaustif, un rapport semblable dans l'expression de ces variantes, puisque

des quatre clones séquencés, nous avons obtenu qu'une seule séquence dont la Gln¹⁴ était omise.

Depuis, la ghreline a été obtenue chez plusieurs espèces (figure 11), où les deux formes résultant de l'épissage alternatif existent aussi, à l'exception de l'espèce bovine^a où la forme ghreline1-28 semble absente. Ainsi, ceci démontre le très haut degré de conservation qu'a la ghreline chez plusieurs espèces, dont le bovin, l'humain, le porc, le chien, la souris et le rat. De même, la ghreline existerait aussi chez plusieurs autres espèces si l'on se base sur la présence répandue de son récepteur GHS-r et sur l'activité notoire qu'exercent les sécrétagogues synthétiques de la somatotrophine (ssST) chez les oiseaux et

	N'	prégh reline	ghreline	C'
Humain (Kojima et al.) ^a		MPSFGTICSLLLLSVLLMADLAMA	GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	
Porcin (pCMV_pGhrelin)		MPSFGTICSLLLLSVLLMADLAMA	GSSFLSPEHQKVQQRKESKKPPAKLQPR	
Porcin (pCMV_pGhrelinΔQ ¹⁴)		MPSFGTICSLLLLSVLLMADLAMA	GSSFLSPEHQKVQQRKESKKPPAKLQPR	
Porcin (Kojima) ^b		MPSFGTICSLLLLSVLLMADLAMA	GSSFLSPEHQKVQQRKESKKPPAKLQPR	
Bovin (Kita et al.) ^c		MPREWTICSLLLLSVLLCM DLAMA	GSSFLSPEHQKLD RKEAKKPPGRLKPR	
Bovin (Kojima) ^d		MPREWTICSLLLLSVLLCM DLAMA	GSSFLSPEHQKLD RKEAKKPPGRLKPR	
canin (Tomasetto et al.) ^e		MPSLQTMCSLLLESVLWV DLAMA	GSSFLSPEHQKLDQRKESKKPPAKLQPR	
rat (Kojima et al.) ^f		MVBSATICSLLLLSMLWM DMAMA	GSSFLSPEHQKLDQRKESKKPPAKLQPR	
souris (Tomasetto et al.) ^g		MLESSTICSLLLLSMLWM DMAMA	GSSFLSPEHQKLDQRKESKKPPAKLQPR	
		proghreline		
Humain (Kojima et al.) ^a		ALAGWLRPEDGGCAEAGAEDELEVRFNAPFDVGIKLSGVQYQQHSQALGKFLQDILWEEAKEAPADK		
Porcin (pCMV_pGhrelin)		ALEGWLGPEDESGEVEGTEDEKLEIRFNAPFDVGIKLSGADSDQHGGPLGKFLQDILWEEVTEAPADK		
Porcin (pCMV_pGhrelinΔQ ¹⁴)		ALEGWLGPEDESGEVEGTEDEKLEIRFNAPFDVGIKLSGADSDQHGGPLGKFLQDILWEEVTEAPADK		
Porcin (Kojima) ^b		ALEGWLGPEDESGEVEGTEDEKLEIRFNAPFDVGIKLSGADSDQHGGPLGKFLQDILWEEVTEAPADK		
Bovin (Kita et al.) ^c		TLEGQFDPEVGSQAEGADELEIRFNAPFNIGIKLAGACBLQHGGTTLGKFLQDILWEEAEEFLANE		
Bovin (Kojima) ^d		TLEGQFDPEVGSQAEGADELEIRFNAPFNIGIKLAGACBLQHGGTTLGK		
canin (Tomasetto et al.) ^e		ALEGSIGPEDTSCVVEEADELEIRFNAPFDVGIKLSGFPVYHCHGQALGKFLQEVLWEDTNEALADE		
rat (Kojima et al.) ^f		ALEGWLPEDRGQAEEAELEIRFNAPFDVGIKLSGADYQQHGRALGKFLQDILWEEVKEAPADK		
souris (Tomasetto et al.) ^g		ALEGWLPEDRGQAEEAELEIRFNAPFDVGIKLSGADYQQHEBALGKFLQDILWEEVKEAPADK		

figure 11: Homologie de séquences en acides aminés de la préproghreline chez l'humain, le porc, le bovin, le chien, le rat et la souris. À remarquer le très haut degré d'homologie de la ghreline, où les acides aminés encadrés sont différents de la séquence humaine. Les deux acides aminés encerclés de la séquences pCMV_pGhrelinΔQ¹⁴ correspondent aux acides aminés de nos séquences porcines qui diffèrent de la séquence publiée par Kojima et coll. en décembre 2000, trois mois après notre soumission initiale en septembre 2000. Ces séquences sont entièrement tirées de GenBank^{MC} dont les # accessions sont : a) BAB19045 ; b) BAB19049 ; c) AF35029 ; d) BAB19047 ; e) CAC29155 ; f) AB029433 ; g) NM021488.

^a Kita, K., Harada, K. et Yokota, H, # accession AF350329, GenBank^{MC} ;
 et Kojima M, # accession AB035702, GenBank^{MC} ;
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>

les poissons (9, 37).

Quelques mois après les soumissions des séquences de la ghreline porcine à GenBank^{MC}, un des membres de l'équipe japonaise qui a initialement décrit la ghreline humaine et de rat, M. Kojima, présenta lui aussi des séquences d'ADNc de la ghreline porcine^a. Les deux séquences de porc soumises par Kojima démontrent aussi qu'il existe une variation de séquence qui omet la Gln¹⁴. La différence entre nos séquences et les siennes est minime : quelques bases de plus au bout 5' non-traduit ont été lues dans nos séquences (5'-AGCCAGGAAGACCAG-3' en plus) tandis que dans le reste des séquences, il n'y a que deux bases différentes dans la proghreline (en référence à la figure 5, page 61 de la section Résultats), en position 417, nous avons obtenu une thymine (T) plutôt qu'une cytidine (C) et en position 475, nous avons obtenu une cytidine (C) plutôt qu'une thymine (T)), sans incidence sur la séquence de la ghreline. Ceci peut être attribuable à une différence génétique individuelle, étant donné que les sources ne soient pas les mêmes et que les différences semblent se produire dans la partie 3' de la séquence non traduite. Également, il se peut que les enzymes utilisés pour le clonage ou le séquençage, soit l'ADN polymérase, incorporent certaines bases de façon erronée, une mutation qui se produirait à une fréquence d'environ 1×10^{-4} . Ces mutations s'additionnent avec le nombre d'étapes de polymérisation nécessaires à l'obtention d'un produit, un phénomène qui se serait produit durant la construction des séquences de ghreline dans pCMV (trois bases sont différentes, position 73, 184 et 237 dans l'une ou l'autre des séquences conservées, se référer à la section Résultats à la page 63). De même, une telle différence est présente ailleurs, soit dans les

^a Kojima M, # accession AB035703 et AB035704, GenBank^{MC}, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>.

séquences protéiques bovines de la ghreline obtenues par Kojima et Kita et coll. (figure 11). À la position 11 de la ghreline, Kojima obtient un glutamate (E) et Kita et coll. obtiennent une lysine (K).

Étant donné la mince différence entre les deux variantes de séquences d'ADNc, c'est-à-dire la délétion du codon de la glutamine en position 14 (voir la figure 5, page 61 et figure 11, page 77), et que cette différence n'est perceptible que par séquençage, nous avons construit deux plasmides qui allaient être facilement distingués, à l'aide de sites de restriction d'endonucléases, une fois leurs intégrations dans pCMV accomplies et nous avons profité du dédoublement des deux sites distants EcoRI présents de part et d'autre du site de clonage de pCMV. En éliminant ainsi un de ces sites, il était possible de faire la distinction des constructions rapidement. Deux approches pour cloner les deux variantes dans pCMV ont été utilisées. C'est pourquoi deux séquences d'ADNc différentes ont été obtenues et intégrées indépendamment dans pCMV.

Les différences de séquences dans les plasmides pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ et pCMV_pGhrelin ont des répercussions seulement sur le changement de codon et d'acides aminés situés dans les séquences de la pré et/ou de la proghreline sans en affecter la séquence de la ghreline. Comme mentionné précédemment, depuis décembre 1999, il existe d'autres séquences publiées de la ghreline chez plusieurs espèces. Si les séquences intégrées dans nos plasmides sont comparées à ces autres séquences, il est remarqué que les codons et les acides aminés mutés dans nos constructions sont très similaires aux séquences déjà existantes. En effet, à la figure 11, page 77, on observe que la séquence théorique en acides aminés de la ghreline est similaire à celle de Kojima, sauf pour quelques acides aminés. Ainsi, la variation dans les séquences de nos constructions pCMV_pGhrelin et

pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ ne devrait pas se répercuter sur l'expression de la ghreline *in vitro* ou *in vivo*.

Initialement, nous avons cru nécessaire d'incorporer les deux variantes d'ADNc dans pCMV, soient la séquence ghreline complète 1-28 et la séquence tronquée 1-27, dont la Gln¹⁴ a été omise par un épissage alternatif. Nous voulions faire la comparaison des deux séquences, lors d'expériences éventuelles en transfection *in vivo*, pour en définir leurs fonctions et leurs actions hypothétiquement différentes.

Jusqu'à présent, plusieurs variantes de la ghreline ont été évaluées pour leur activité cellulaire et biologique. Il a été clairement démontré que la ghreline Δ Q¹⁴ injectée par voie intraveineuse à 4 μ g/kg et 20 μ g/kg chez des rats anesthésiés au pentobarbital a produit une réponse en ST en relation proportionnelle de la dose injectée (50), mais aucune autre comparaison entre les deux variantes naturelles de ghreline n'a été faite. Aussi, une équipe de chercheurs de Merck (4) a démontré que la ghreline(1-5)^a était la structure minimale requise pouvant induire une variation du calcium intracellulaire sur des cellules (HEK-293) parsemées en surface de récepteur humain pour la ghreline, hGHS-r1a. Dès lors, nos objectifs de déterminer les différences d'activité sur la ST entre la ghreline(1-28) et la ghreline Δ Q¹⁴ sont apparus désuets, puisque la queue C' terminale (6-28) ne serait qu'accessoire. Cette étude de conformation minimale de la ghreline a été par la suite appuyée et complétée par une autre étude (72) qui allait confirmer la même structure minimale de la ghreline, soit la ghreline(1-5). Cependant, un bémol est apporté à ces deux expériences sur la structure minimale de la ghreline : elles ont toutes été menées *in vitro*.

^a Lorsqu'il est mention de ghreline, cela implique qu'elle est octanoylée en Ser³, sinon, il en est indiqué autrement.

Lors d'expérience *in vivo* chez le rat, il est rapporté que la ghreline(1-13) n'a aucune activité (12), mais que la ghreline(1-18) serait équipotente à la ghreline(1-28) (101).

Jusqu'à présent, il est défini que la structure minimale de la ghreline active *in vivo* existerait au moins sous les formes ghreline(1-28) ou ghreline Δ Q¹⁴(1-27). Mais rien encore n'a été fait sur la comparaison des effets physiologiques, i.e. au-delà des effets somatotropes, de ces deux variantes de ghreline.

Puisque les travaux avec pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ étaient terminés et que l'activité de la ghreline Δ Q¹⁴ sur la ST semblait équivalente à la forme ghreline(1-28), alors, nous avons initialement procédé aux transfections *in vitro* avec cette dernière construction et aussi avec la construction pCMV_pGRF préalablement acquise.

5.2. TRANSFECTION *IN VITRO*

La transfection *in vitro* effectuée avec pCMV_pGRF a mené à une synthèse de pGRF immunoréactif. Le radio-immunodosage réalisé sur les milieux de culture et non sur les lysats de cellules, confirme que la séquence de l'ADNc du pGRF a permis la sécrétion extracellulaire d'un peptide immunoréactif. Toutefois, ces milieux de cultures contenant du pGRF immunoréactif n'ont pas été évalués pour leur activité sur des cellules somatotropes porcines ou autre pour en vérifier leur activité libératrice après liaison sur le récepteur. Cette validation n'a pu être effectuée dans notre laboratoire en raison de limitations techniques. Cependant, la méthodologie suivante aurait pu être adoptée : les surnageants de cultures cellulaires transfectées auraient été transmis sur une couche de cellules somatotropes pendant quelques heures, pour ensuite récolter le surnageant et y doser la ST. Des cultures de cellules somatotropes (GH₃) à partir d'hypophyse antérieure de porc ou d'autres espèces

auraient pu être utilisés (34, 57). Une autre alternative aurait été de se procurer des cellules tumorales GH₃ d'hypophyse antérieure de rat chez American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) (# cat CCL-82.1)^a (56) pour effectuer ces validations sur l'activité de la somatocrine.

Nous avons évité cette étape d'évaluation puisque les rapports de deux études intensives de l'équipe composée de Xuyang et coll. (111) et Draghia-Akli et coll. (25) font part de résultats de transfection *in vitro* menant à des concentrations de pGRF comparables à ceux que nous avons obtenus. Leurs systèmes de vecteurs étaient semblables aux nôtres, c'est-à-dire qu'ils utilisaient un vecteur avec le promoteur CMV contenant l'ADNc du GRF humain. Ils ont réalisé par la suite des transfusions *in vivo* chez la souris qui ont mené à une augmentation des concentrations circulantes de somatotrophine (ST) et à des effets systémiques caractéristiques de telles augmentations.

D'un autre côté, les transfusions réalisées *in vitro* avec pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ sur des cellules adénocarcinomaux de souris n'ont pas mené à une détection de pGhrelin immunoréactif significativement différente des cellules non transfusées. Tel que rapporté précédemment, le dosage RIA de la ghreline a été faite outremer, i.e. au Japon dans le laboratoire de M. Kojima pour la détection de la ghreline(1-11) humaine et octanoylée en Ser³. Malheureusement, à cause de contraintes diverses, les échantillons sont arrivés à destination sept jours après leur départ. Lorsqu'ils ont été récupérés, ils étaient décongelés. Cette décongélation a peut-être favorisé une désintégration de la ghreline de façon spontanée (admettant une ghreline instable) ou encore, le milieu de culture comptait peut-être des protéases actives. La stabilité de la ghreline et sa subjectivité aux protéases n'ont pas encore

^a <http://www.atcc.org>,

été déterminées, mais des études laissent entendre que la ghreline aurait une demi-vie physiologique courte de l'ordre de 10 minutes (79) ou de 15 à 30 minutes (104). Néanmoins, aucune validation de la technique de dosage n'a été établie spécifiquement avec le milieu de culture cellulaire pour en déterminer une interférence. Il est à remarquer que les concentrations de ghreline dans les milieux de cultures cellulaires témoins correspondent à un niveau normal plasmatique chez l'humain, soit 100 à 120 fmol/mL (58, 60) (ou ~330 à 400 pg/mL) et il a été impossible d'obtenir des détails sur les limites de dosages. Les glandes surrénales et le rein de souris ne produisent pas substantiellement de ghreline (49), cependant, sa synthèse a été détectée dans le rein complet de souris (76). Ainsi, la transfection n'aurait pas mené à une ghreline immunoréactive dans le milieu de culture parce qu'elle n'y était pas sécrétée ou synthétisée correctement ou peut-être dégradée lors de la décongélation.

La conclusion sur l'expression de la ghreline *in vitro* serait différente si nous avions connu les limites du dosage et si nous connaissions qu'une interférence était intervenue entre le milieu de culture et les anticorps utilisés dans le RIA, puisqu'en fait, aucune validation de ce dosage n'a été faite avec le milieu de culture utilisé. Cependant, la variation des niveaux moyens de ghreline est plus grande dans les milieux de cultures non-transfectés comparativement à ceux qui ont été transfectés. L'équipe française de Tomasetto et coll. qui avait décrit la MTLRP (la MTLRP se trouve à être le même peptide que la ghreline qui ont été découvertes simultanément par des moyens alternatifs par une équipe japonaise et une équipe française), ont transfecté avec l'ADNc de cette protéine (dont la Ser³ s'est montré normale, i.e. non-octanoylée (selon 22)) dans des cellules COS-1 (102) et ils avaient conclu que le peptide issu de cette ADNc était inactif (selon 22, aucun détail n'est donné dans cette

communication sur l'évaluation du peptide issu de la transfection sur des cellules arborant le GHS-r). Ceci suggère que la machinerie cellulaire pour l'octanoylation pourrait être restreinte à certains types de cellules ou de tissus (22). Donc, notre système de transfection *in vitro* n'était peut-être pas approprié pour obtenir une ghreline active, i.e. octanoylée en Ser³.

5.3. TRANSFECTION *IN VIVO*

Expérience I : Dans l'essai préliminaire de transfection *in vivo* avec pCMV_pGRF et la spermidine comme dispositif d'administration chez cinq groupes de souris en fin de croissance, inexplicablement, il s'est produit une tendance à une influence négative sur les concentrations de pGRF chez les deux groupes de souris recevant la spermidine comme dispositif d'administration. Malgré de fortes différences de perte de poids de certains groupes traités en comparaison au groupe témoin, en particulier avec le groupe 100 µg pCMV_pGRF sans spermidine ($p=0,005$), aucun effet escompté sur le poids entre les différents traitements n'a été obtenu. Ces données statistiques sont apparues fortement significatives dans cette analyse en raison de la petitesse de la variance de certains groupes étant donné que le test statistique utilisé (i.e. le test de Student) compare les variances. Toutefois, la perte de poids des groupes traités comparativement au groupe témoin peut être attribuable à l'anesthésie puisque les groupes traités ont été anesthésiés lors de la transfection au jour 0, tandis que le groupe témoin n'a jamais été anesthésié.

Ces transfusions *in vivo* chez la souris que nous avons réalisées avec de l'ADN pCMV_pGRF nu ou avec spermidine n'ont pas eu d'influence sur la croissance (i.e. la prise de poids) et se comparent à une transfection *in vivo* chez la souris où un adénovirus atténué

transportant l'ADNc de la mST a donné des résultats significatifs de gain de poids et d'augmentation de la concentration de mST uniquement chez des souris adultes naines, comparativement à des souris adultes normales chez qui le même traitement adénoviral n'a pas eu d'influence sur le gain de poids (68). Ainsi, notre système expérimental de transfection avec le pGRF chez des souris normales en fin de croissance n'aurait pas été approprié afin d'observer des changements perceptibles sur des paramètres zootechniques tel que le gain de poids. Cependant, une étude réalisée dans des conditions d'expérimentation semblable aux nôtres, i.e. chez des souris adultes normales ayant subi une transfection avec un vecteur d'ADN nu (pCMV + GRF humain, sans dispositif d'administration) par voie intramusculaire sous anesthésie, a démontré que les concentrations de ST, prise de façon ponctuelle, augmentait de 200 % après sept jours (111).

Expérience II : Selon cette même étude (111), nous aurions dû obtenir une augmentation de pGRF et de poids corporel lorsque nous voulions évaluer un deuxième dispositif d'administration, soit le DOTAP-Cl en comparaison à l'ADN nu, en plus d'explorer trois autres modes d'administration, soient intramusculaire, intraveineux ou intraveineux par hydrodynamisme. Nous avons obtenu le même genre de conclusion, c'est-à-dire que les concentrations plasmatiques de pGRF n'ont pas augmenté comparativement au témoin, indépendamment du dispositif ou du mode d'administration, y compris l'ADN nu. Aussi, aucun effet sur les poids des souris traitées n'a été obtenu, à l'exception que le DOTAP a provoqué une perte de poids chez les souris recevant ces traitements, particulièrement dans le cas du groupe intraveineux, dont le tissu cible était le poumon. Il a été décrit qu'une dose optimale de DOTAP menant à une transfection maximale se situait à 900 nmol par animal (de ~15 g) et qu'une dose de 1200 nmol de DOTAP était létale (67).

Aussi, les études sur lesquelles nous nous étions basés pour le choix de la dose de DOTAP (95) et la voie intraveineuse par hydrodynamique (67, 112), toutes réalisées par le même groupe de chercheurs, vantaient l'augmentation de la synthèse de la protéine transgénique (β -Gal ou luciférase) par l'une ou l'autre de ces méthodes. Pourtant, dans aucun cas, nous avons obtenu une synthèse accrue de pGRF chez nos souris.

Aussi, plus concrètement appliquée à la transfection *in vivo* avec l'ADNc nu du GRF humain dans pCMV, injecté à 50 μ g par souris par voie intramusculaire précédé d'un dommage tissulaire provoqué par une injection d'anesthésiant dans le muscle transfecté, l'équipe de Draghia-Akli et coll. (25) ont démontré avec des analyses Northern et des RT-ACP précédées d'étapes d'ADNase double, que le GRF était exprimé sous forme d'ARNm. Il importe de souligner le fait qu'ils aient procédé à deux étapes consécutives d'ADNase, car ceci confirme et appuie fortement nos difficultés à démontrer clairement l'expression dans nos transfections par RT-ACP à cause de la présence constante d'ADN plasmidique (voir figure 10, page 75). Comme mentionné précédemment, il apparaît à cette figure une contamination des contrôles négatifs que sont l'eau. Ces contrôles apparaissent positifs dans cette exercices, mais cela n'est qu'une représentation d'une des nombreuses tentatives de RT-ACP réalisées par des expérimentateurs différents en des lieux différents. Toutes ces RT-ACP ont démontré une contamination en différents points ; celle-ci a été choisie en exemple de contamination et aussi étant donnée sa meilleure cohérence tout au long de l'analyse. L'équipe de Draghia-Akli et coll. (25) aurait elle aussi rencontré des difficultés dans la démonstration exclusive de l'expression, mais il semble que deux étapes d'ADNase auraient suffi dans leur cas à éliminer le plasmide désormais présent.

Aussi, cette même étude de Draghia-Akli et coll. avait démontré que des souris transfectées avec pCMV + GRF humain avaient une croissance accrue et significative par rapport à des groupes témoins recevant une transfection avec pCMV + LacZ (*β -galactosidase*). Ils n'ont cependant jamais démontré que la transfection témoin avec LacZ gêne à la croissance ou induit d'autre réaction (e.g. réaction immunologique) impliquant des effets secondaires néfastes. L'établissement de groupe témoins appropriés est d'autant plus primordial dans ce cas-ci. Malgré tout, des résultats significatifs d'augmentation de ST ponctuelle, d'augmentation d'IGF-1 hépatique et d'expression de GRF dans les muscles transfectés ont été démontrés. Ces résultats sont toutefois discutables : l'augmentation de ST ponctuelle fut transitoire avec de grandes variations (e.g. transfectées $36,28 \pm 27,28$ vs témoins $8,2 \pm 1,9$ ng/mL, n=5), ces variations peuvent être attribuables au profil pulsatif de la ST et l'IGF-1 n'a pas été dosée ni analysée statistiquement mais plutôt évaluée visuellement par Northern.

Expérience III : Lors de la transfection par électrotransfert (GET) chez le rat, on assiste à une perte de poids chez tous les animaux, y compris le groupe témoin (figure 9, page 71). Cette perte de poids peut être associée aux manipulations, dont l'anesthésie, comme l'a démontré notre première étude chez la souris. Puisque la perte de poids tend à s'estomper avec le temps dans tous les groupes et que les anesthésies ont été répétées, cette perte de poids initiale peut être davantage attribuable à des effets secondaires de la GET. Cependant, la reprise de poids semble s'améliorée chez tous les groupes transfectés et elle semble plus prononcée dans le groupe recevant la transfection avec la ghreline seule (figure 9 (d), page 71 et tableau II, page 72). Cette reprise significative avec la ghreline seule comparativement au GRF seul ou en combinaison pourrait être attribuée hypothétiquement

aux influences différentes chez le rat de chacun des peptides sur le métabolisme. En particulier, la ghreline agit sur l'augmentation de la prise alimentaire par l'entremise du neuropeptide Y (NPY) (78, 104) et possède d'autres activités sur la balance énergétique (104), le métabolisme (104) et l'accrétion de matière grasse (62), qui sont tous des phénomènes décrits chez le rat comme étant indépendants de la ST. Encore, cette différence dans les poids corporels pourrait être conférée à une réaction immunitaire qui gênerait la reprise de poids.

La différence dans les séquences des peptides porcins et de rats est davantage plus grande avec le GRF (~73% d'homologie) qu'avec la ghreline (~93% d'homologie). Une étude a démontré la réaction immunitaire engendrée chez la souris suite à une transfection avec le GRF humain, dont le degré d'homologie est comparable à celui du rat et du porc, mais cette réaction semblait légèrement diminuée du jour 21 au jour 28 (25). Ainsi, la présence d'anticorps anti-GRF aurait bloqué l'action du GRF ou encore, dans le cas du groupe électrotransfecté pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴ et pCMV_pGRF, aurait ralenti le métabolisme à cause d'effets secondaires néfastes, tels que fièvre, perte d'appétit, etc... reliés à une immunisation active involontaire. Quelques études stipulent que le «transgène» doit être propre à l'espèce (25, 97, 103) afin d'obtenir la réponse escomptée par celui-ci puisque une inhibition de la réponse pourrait se produire. Une étude rapporte que, dans un contexte *in vitro*, l'interféron- γ (INF- γ) inhibe l'expression dirigée par CMV (43). Ceci n'impliquerait pas nécessairement l'entraînement du promoteur CMV à induire une réaction immunitaire, en particulier via INF- γ . Ainsi, si le produit du transgène induit une réaction immunitaire de par sa protéine étrangère, il pourrait s'y produire une inhibition par INF- γ de l'expression conduite sous CMV. Il se pourrait en fait qu'un antigène issu d'un transgène

provoque une réponse de type Th2 ou de type Th1 selon la dose présente (97). Une réponse des lymphocytes de type «helper 2», ou Th2, est caractérisé par la sécrétion de d'interleukine-4 et interleukine-5, tandis qu'une réponse des lymphocytes de type «helper 1» (ou Th1) se caractérise par la sécrétion d'IFN- γ . Si tel est le cas, une réponse Th1, favorisée dans le cas d'une faible dose d'antigène, augmenterait l'INF- γ et mènerait alors à une inhibition de notre système avec le promoteur CMV (97).

Même si ces rats avaient développé des anticorps contre le pGRF, l'objectif principal à cette étape-ci était d'utiliser le rat comme modèle avant de transfecter le porc. Il a été montré que des injections par voie sous-cutanée (données issues de notre laboratoire et non publiées) ou qu'une transfection (25, 111) chez la souris ou le rat avec le GRF humain amenait une élévation des concentrations sériques de ST et d'IGF-1, toutefois transitoire (7 jours) dans les cas de transfections, malgré une immunisation contre le hGRF. Bien évidemment, il aurait été préférable d'utiliser les séquences d'ADNc propre à l'espèce testé dans nos études.

Malgré une tendance non significative de reprise de poids chez les animaux transfectés avec les ADNc de la ghreline avec ou sans le GRF, on n'a observé aucune augmentation significative de rST. Lors d'une stimulation de la ST par le GRF ou la ghreline dans un contexte d'anesthésie semblable, on aurait dû s'attendre à des niveaux de rST de l'ordre de 300 à 500 ng/mL (58). Dans cette étude, les niveaux de rST sont bien en dessous de cette intervalle.

Mais une problématique considérable avec le pGRF (de même qu'avec la ghreline) est sa demi-vie et sa fragilité face aux protéases. L'équipe de Draghia-Akli et coll. ont démontré qu'un analogue du pGRF, dont la séquence d'ADNc a été modifiée au niveau de

cinq codons où les acides aminés sont critiques dans la reconnaissance de sites de clivage, pouvait être synthétisé par transfection *in vivo* afin de créer une résistance aux protéases et ceci avait pour cause d'augmenter sa demi-vie à plus d'une heure dans le plasma (26). Nous avons tenté de faire un tel analogue d'ADNc du pGRF, mais plusieurs embûches ont été rencontrées et cette construction n'a pu être terminée. Afin de diminuer la distance parcourue par le GRF avant d'accéder à l'hypophyse, une approche tentée par plusieurs groupes de recherche est de faire la transfection du gène d'intérêt à même le tissu cible, c'est-à-dire l'hypophyse (révisé dans 55). Mais, malheureusement, techniquement difficile à réaliser, la thérapie génique sur cette glande ne serait pas applicable à nos objectifs de production animale, car trop ardue à réaliser en raison de l'utilisation de l'injection stéréotaxique, une technique de précision qui vise à percer le crâne et à faire une injection ultra-précise dans l'hypophyse. Aussi, il a été tenté de cibler la transfection de l'hypophyse par l'utilisation d'un récepteur localisé sur les cellules hypophysaires pouvant lier un adénovirus injecté par voie intraveineuse. Cette technique n'a pas été retenue puisque la transfection s'est avérée inefficace du fait que peu d'agent transfectant puisse rejoindre l'hypophyse dû au flot limité de la circulation sanguine l'alimentant (révisé dans 55).

L'électrotransfert génique (GET) nous avait laissé miroiter un espoir de réussite puisque de Draghia-Akli et coll. avaient réussi en 1999 (26) en employant cette technique, avec un plasmide comprenant à la fois la séquence d'ADNc du pGRF (GRF naturel ou GRF analogue résistant aux protéases) et un promoteur spécifique au muscle. Notre système n'était peut-être pas aussi apte à cause du promoteur du CMV, mais il reste que cette équipe a réussi à obtenir après plus de 30 jours une croissance significativement plus élevée avec la transfection de l'ADNc du pGRF analogue et au bout de 60 jours avec l'ADNc du pGRF

naturel. Aussi, ils ont fait une démonstration d'augmentation significative des niveaux circulants de pST et d'IGF-1 pour ces mêmes porcs transfectés en comparaison à des animaux témoins. Toutefois, leur étude ne comptait que deux porcs par groupes, ce qui est statistiquement très faible.

Étant donné que les niveaux de ST des rats ayant reçus le GET n'ont pas été modifiés, mais que le suivi de poids semble laisser croire en des effets positifs (figure 9d, page 71) reliés à des augmentations de ghreline et/ou de GRF, les étapes qui demeurent à compléter à présent sont les dosages de pGRF et de pGhrelin. Ces dosages n'ont pas été faits en raison de restrictions diverses dans nos laboratoires. Mais ces analyses sont en fait critiques dans la formulation d'une conclusion à savoir si les transfections, spécialement la GET, a mené à une synthèse *in vivo* de peptides et en particulier, à une synthèse de ghreline octanoylée dans le muscle. Si la ghreline fabriquée par le muscle est bel et bien octanoylée, cela impliquerait qu'elle est active et que la machinerie moléculaire pour l'acylation est présente dans le muscle. En thérapie génique, le mode d'administration par voie intramusculaire semble préférentiellement utilisée, puisqu'elle est facile à réaliser. Ainsi, si la synthèse de la ghreline était possible dans les muscles, cela impliquerait de grandes possibilités d'applications pour la thérapie génique avec la ghreline.

Malgré qu'aucune démonstration de l'expression d'un des ADNc de la pGhrelin ou du pGRF n'ait été réussie, il est d'autant plus certain que l'ADN plasmidique réussi à pénétrer au niveau des cellules transfectées pendant plus de 21 jours (figure 10, page 75). De plus, cet ADN plasmidique semble demeuré en très grande quantité dans la cellule puisque trois étapes mises de l'avant pour exclure l'ADN ont été réalisées, soient : l'étape d'isolement de l'ARN totale sur colonne qui devrait rejeter l'ADN plasmidique et les étapes

consécutives d'exonucléases, comme Draghia-Akli et coll. (26), qui devraient détruire complètement cet ADN. Une analyse par Northern aurait pu faciliter l'exclusion du plasmide puisque le plasmide n'aurait pas migré à la même distance que les ARNm des ADNc de la ghreline et du GRF. Aussi, la conception des constructions plasmidiques aurait dû se faire en incluant les introns existants dans les gènes de la ghreline et du GRF. En plus d'améliorer la transcription (63), la présence d'un intron aurait mené à des produits d'ACP issus des plasmides facilement distinguable des produits messagers.

6. CONCLUSION

La ghreline est un peptide synthétisé par les cellules endocriniennes du tube digestif et plus particulièrement dans les cellules situées dans la sous-muqueuse de l'estomac. Ce peptide détient une activité de libération somatotrope en plus d'avoir d'autres fonctions reliées au métabolisme et à l'alimentation. Initialement décrite chez le rat et l'humain, nous rapportons ici les séquences des ghreline(1-28) et ghreline Δ Q¹⁴(1-27) spécifiques à l'espèce porcine.

La ghreline serait le ligand endogène du récepteur des secrétagogues synthétiques de la somatotrophine (ST), ou ssST. Les ssST administrés en présence de GRF ont démontré une synergie de libération de la ST et des démonstrations équivalentes ont été réalisées avec la ghreline et le GRF.

Dans le cadre de la production animale, les effets zootechniques entourant une stimulation de la croissance par le GRF et/ou les ssST se résument en une diminution de l'accrétion lipidique de même qu'une augmentation de la rétention azotée en parallèle à une incorporation des acides aminés menant à une carcasse à la fois plus maigre et plus volumineuse en masse musculaire. Une problématique réside toutefois en l'administration continue de GRF et/ou de ghreline. Admettant une action synergétique de la ghreline et du GRF, une plus faible quantité de chacun de ces peptides serait nécessaire et plus avantageux qu'un de ces peptides administrés seuls afin de rencontrer des effets zootechniques attrayants.

La transfection *in vivo* permet la synthèse continue ou contrôlée de peptides et nous avons tenté de suggérer et de démontrer un modèle de transfection *in vivo* pouvant répondre à la problématique de l'administration continue de GRF et/ou de ghreline. Nous avons

démontré qu'un plasmide détenant l'ADNc du GRF porcin (pGRF) sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus humain (CMV) produisait, suite à une transfection *in vitro*, un peptide pGRF immunoréactif en grande quantité. Cependant, un même plasmide contenant l'ADNc de la ghreline ΔQ^{14} porcine n'a pas mené à une détection de ghreline immunoréactive.

In vivo chez le rat et la souris, nous avons réalisé de telles transfections à plusieurs reprises, tentant de chercher un mode et un dispositif d'administration fiables. À l'inverse de la littérature existant sur le sujet, nous n'avons pas eu de synthèse de pGRF ou encore de pGhrelin ΔQ^{14} dans aucune des tentatives menées avec des plasmides nus, supportés par la spermidine ou le DOTAP, par voies intramusculaire, intraveineuse, par principe hydrodynamique (HD) ou par électrotransfert génique (GET). Nous pouvons conclure que la spermidine semblait abaisser les niveaux de GRF chez la souris en fin de croissance et que le DOTAP à une dose de 900 nmol était nuisible à la croissance corporelle chez la souris en pleine croissance, formant ainsi deux dispositifs d'administration incompatibles à notre application. D'autre part, aucune des voies d'administration ne s'est démarquée dans la synthèse du transgène pGRF chez la souris. La GET avec les plasmides pCMV_pGRF et pCMV_pGhrelin ΔQ^{14} réalisée chez le rat, malgré ses effets néfastes sur la croissance accompagnant les anesthésies répétées, n'aurait pas provoqué de stimulation de la ST mais aurait peut-être permis une meilleure récupération suite aux traitements avec les ADNc du pGRF, du pGRF en association avec celle de la ghreline ou plus particulièrement avec celle de la ghreline seule.

Nous avons démontré que l'ADN de transfection peut demeurer dans les tissus transfectés pour plus de 17 à 21 jours. Malgré que l'expression de ces systèmes n'ait pas été

démontrée, la présence d'ADN de transfection dans les cellules des tissus traités confirme que la technique de transfection *in vivo* a une solide base d'application. Toutefois, ceci démontre quand même que la transfection *in vivo* pour la thérapie génique n'est pas à point.

À présent, il ne reste qu'à réaliser des dosages RIA de la ghreline et du GRF sur les échantillons de plasma de rats qui ont été traités par électrotransfert génique (GET) avec les plasmides pCMV_pGRF et pCMV_pGhrelin Δ Q¹⁴. De même, afin de compléter les analyses, des transferts Northern seraient préférés à des RT-ACP pour démontrer l'expression des systèmes de transfection.

BIBLIOGRAPHIE

1. Aihara H, Miyazaki J-I (1998) Gene transfer into muscle by electroporation in vivo *Nature Biotechnology*. **16**:867-70.
2. Arvat E, Maccario M, DiVito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Cadanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E (2001) Endocrine Activities of Ghrelin, a Natural Growth Hormone Secretagogue (GHS), in Humans: Comparison and Interactions with Hexarelin, a Nonnatural Peptidyl GHS, and GH-Releasing Hormone *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **86**:1169-74.
3. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujumiya M, Nijima A, Fujino M A, Kasuga M (2001) Ghrelin Is an Appetite-Stimulatory Signal From Stomach With Structural Resemblance to Motilin *Gastroenterology* **120**:337-45.
4. Bednarek M A, Feighner S D, Pong S-S, McKee K K, Hreniuk D L, Silva M V, Warren V A, Howard A D, Van der Ploeg L H Y, Heck J V (2000) Structure-Function Studies on the New Growth Hormone-Releasing Peptide, Ghrelin: Minimal Sequence of Ghrelin Necessary for Activation of Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a. *Journal of Medicinal Chemistry* **43**:4370-4376.
5. Blaese R M, Culver K W, Miller A D, Carter C S, Fleischer T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstochev P, *et coll.* (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years *Science* **270**:475-80.
6. Bloch B, Brazeau P, Ling N, Bohlen P, Esch F, Wehrenberg W B, Benoit R, Bloom F, Guillemin R (1983) Immunohistochemical detection of growth hormone-releasing factor in brain *Nature* **301**:607-8.
7. Bowers C Y, Momany F, Reynolds G A, Chang D, Hong A, Chang K (1980) Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology* **106**:663-667.
8. Bowers C Y, Momany F A, Reynolds G A, Hong A (1984) *Endocrinology* **106**:663-7 dans Date Y, Murakami N, Kojima M, Kuroiwa T, Matsujura S, Kangawa K, Nakasato M (2000) Ventral Effets of a Novel Acylated Peptide, Ghrelin, on Growth hormone Release in Rats *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **275**:477-80.

9. Bowers C Y, Momany F A, Reynolds G A, Hong A (1984) On the *in vitro* and *in vivo* activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone *Endocrinology* **114**:1537-45.
10. Bowers C Y, Reynolds G A, Durham D, Barrera C M, Pezzoli S S, Thorner M O (1990) Growth Hormone (GH)-Releasing Peptide Stimulates GH Release in Normal Men and Acts Synergistically with GH-Releasing Hormone *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **70**:975-82.
11. Bowers C Y, Reynolds G A, Chang J K (2000) Unnatural GHRP and Natural Ghrelin Linkage *Proceedings of the 82nd Annual Meeting of The Endocrine Society, Toronto, Canada Abstract #689*:pp170.
12. Bowers C Y (2001) Unnatural Growth hormone-Releasing Peptide Begets Natural Ghrelin *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86**:1464-9.
13. Chang C H, Hickey G J (1999) Les sécrétagogues synthétiques de la somatotrophine (sST) et leur utilisation éventuelle chez les animaux de compagnie et de consommation *Le médecin vétérinaire du Québec* **29**:71-6.
14. Cheng K, Chan W W-S, Barreto A Jr, Convey E M, Smith R G (1989) 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 Primary Pituitary Cell Culture *Endocrinology* **124**:2791-8.
15. Clackson T (2000) Regulated gene expression systems *Gene Therapy* **7**:120-5.
16. Coleman M E, Pursel V G, Wall R J, Haden M, DeMayo F, Schartz R J (1991) Regulatory sequences from the avian skeletal α -actin gene direct high level expression of a human insulin-like growth factor I cDNA in skeletal muscle of transgenic pigs *Sciences* **73 (suppl)**:1507.
17. Collier R, McGrath M F, Vincini, J L (1999) La somatotrophine bovine et l'industrie laitière américaine. *Le médecin vétérinaire du Québec* **29**:89-92.
18. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal M S, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2000) 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* **141**:4255-4261.

19. Date Y, Murakami N, Kojima M, Kuroiwa T, Matsujura S, Kangawa K, Nakasato M (2000) Central Effects of a Novel Acylated Peptide, Ghrelin, on Growth Hormone Release in Rats *Biochemical and Biophysical Research Communications* **275**:477-80.
20. Deghenghi R, Papotti M, Ghigo E, Muccioli G (2001) Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland *Journal of Endocrinological Investigation* **24** (1):RC1-3.
21. De Lecea L, Criado J R, Propero-Garcia O, Gautvik K M, Schweitzer P, Danielson P E, Dunlop C L, Siggins G R, Henriksen S J, Sutcliffe J G (1996) A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties *Nature* **381**:242-5.
22. Del Rincon J P, Thorner M O, Gaylinn B D Motilin-Related Peptide and Ghrelin: Lessons From Molecular Techniques, Peptide Chemistry, and Receptor Biology and Coulie B J, Miller L J Identification of Motilin-Related Peptide and Tomasetto C, Rio M-C Reply (2001) *Gastroenterology* **120**:587-9.
23. Dieguez C, Casanueva F F Ghrelin: a step forward in the understanding of somatotroph cell function and growth regulation *European Journal of Endocrinology* **142**:413-7.
24. Doscher M E, Baker P K, Kraft L A, Ricks C A (1984) Effect of a synthetic growth hormone releasing hexapeptide (BI 679) and growth hormone releasing factor (GRF) on serum growth hormone levels in barrows *Journal of Animal Science* **59**(Suppl):218 dans Bowers C Y, Reynolds G A, Durham D, Barrera C M, Pezzoli S S, Thorner M O (1990) Growth Hormone (GH)-Releasing Peptide Stimulates GH Release in Normal Men and Acts Synergistically with GH-Releasing Hormone *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **70**:975-82.
25. Draghia-Akli R, Li X, Schwartz R J (1997) Enhanced growth by ectopic expression of growth hormone releasing hormone using an injectable myogenic vector. *Nature Biotechnology* **15**:1285-1289.
26. Draghia-Akli R, Fiorotto M L, Hill L A, Malone P B, Deaver D R, Schwartz R J (1999) Myogenic expression of an injectable protease-resistant growth hormone-releasing hormone augments long-term growth in pigs. *Nature Biotechnology* **17**:1179-1183.

27. Drisko J E, Faidley T D, Chang C H, Zhang D, Nicolich S, Hora D F, McNamara L, Rickes E, Abribat T, Smith R G, Kickey G J (1998) Hypophyseal-Portal Concentration of Growth Hormone-Releasing Factor and Somatostatin in Conscious Pigs: Relationship to Production of Spontaneous Growth Hormone Pulses *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **217**:188-96.
28. Dubreuil P (août 1985), Effets de la somatocrinine et d'un anticorps dirigé contre la somatostatine sur le développement corporel du rat et celui de son système digestif, mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke.
29. Dubreuil P, Couture Y, Pelletier D, Delorme L, Lapierre H, Gaudreau P, Morisset J, Brazeau P (1990) Effect of Long term Administration of pGRF and (or) TRF on Growth Hormone, Prolactin and Thyroxine Concentration in Growing Pigs *Journal of Animal Science* **68**:95-107.
30. Dubreuil P, Petitclerc D, Pelletier G, Gaudreau P, Farmer C, Mowles T F, Brazeau P (1990) Effect of Dose and Frequency of Administration of a Potent Analog of Human Growth Hormone-Releasing Factor on Hormone Secretion and Growth in Pigs *Journal of Animal Science* **68**:1254-68.
31. Dubreuil P, (1999) Effets de la somatotrophine sur la santé des vaches laitières. *Le médecin vétérinaire du Québec* **29**:93-98.
32. Dubreuil P, Farmer C, Lapierre H (1999) La somatocrinine : son potentiel en production animale *Le médecin vétérinaire du Québec* **29**:81-7.
33. Etherton T D (1999) Effets de la somatotrophine sur les paramètres zootechniques de croissance chez le porc. *Le médecin vétérinaire du Québec* **29**:77-80.
34. Farmer C, Pommier S A, Brazeau P (1993) Validation of a Culture System for Porcine Pituitary Cells: Effects of Growth Hormone-Releasing and(or) Somatostatin on Growth Hormone Secretion *Journal of Animal Science* **71**:923-929.
35. Fisher K D, Ulbrich K, Subr V, Ward C M, Mautner V, Blakey D, Seymour L W (2000) A versatile system for receptor-mediated gene delivery permits increased entry of DNA into target cells, enhanced delivery to the nucleus and elevated rates of transgene expression *Gene Therapy* **7**:1337-43.
36. Furuse M, Tachibana T, Ohgushi A, Ando R, Yoshimatsu T, Denbow D M (2001) Intracerebroventricular injection of ghrelin and growth hormone releasing factor inhibits food intake in neonatal chicks *Neuroscience Letters* **301**:123-6.

37. Geris K L, Hickey G J, Berghman L R, Visser T J, Kuhn E R, Darras V M (1998) Pituitary and extrapituitary actions sites of the novel nonpeptidul growth hormone (GH) secretagogue L-692,429 in the chicken. *Gen Comp Endocrinol* **111**:186-196.
38. Giusti M, Lomeo A, Mazzocchi G, Mignone D, Sessarego P, Monachesi M, Giordano G (1985) The effects of growth hormone-releasing factor (GRF) and dopamine on growth hormone (GH) secretion in acromegaly *Journal of Endocrinological Investigation* **8**:203-6.
39. Grévisse M (1969) Précis de grammaire française Éd. Duculot, Paris-Gembloux.
40. Gualillo O, Caminos J E, Blanco M, García-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F F (2001) Ghrelin, A Novel Placental-Derived Hormone. *Endocrinology* **142**:788-794.
41. Gualillo O, Caminos J E, Kojima M, Kangawa K, Arvat E, Ghigo E, Casanueva F F, Diéguez C (2001) Gender and gonadal influences on ghrelin mRNA levels in rat stomach *Europeen Journal of Endocrinology* **144**:687-90.
42. Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg W B (1982) Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromefaly *Science* **218**:585-7
43. Harms J S, Splitter G A (1995) Interferon- γ Inhibits Transgene Expression Driven by SV40 or CMV Promoters but Augments Expression Driven by the Mammalian MHC I Promoter *Human Gene Therapy* **6**:1291-7.
44. Hartikka J, Bosoukova V, Jones D, Mahajan R, Wloch M K, Sawdey M, Buchner C, Kukhu L, Barnhart K M, Abai A M, Meek J, Shen N, Manthorpe M (2000) Sodium phophate enhances plasmid DNA expression in vivo *Gene Therapy* **7**:1171-82.
45. Harvey S, Scanes C G, Daughaday W H (1995) Growth Hormone CRC Press, Florida, USA.
46. Heller L, Jaroszeski M J, Coppola D, Pottinger C, Gilbert R, Heller R (2000) Electrically mediated plasmid DNA delivery to hepatocellular carcinomas in vivo *Gene Therapy* **7**:826-9.
47. Hervey F, Castel P (2000) Plant-product and crop biotechnology *Trends in Biotechnology* **13**:565-8.

48. Herweijer H, Zhang G, Subbotin VM, Budker V, Williams P, Wolff JA (2001) Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver *Journal of Gene Medicine* **3**:280-91.
49. Hosoda H, Kokima M, Matsuo H, Kangawa K (2000) Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **279**:909-913.
50. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K (2000) Purification and Characterization of Rat des-Gln¹⁴-Ghrelin, a Second Endogenous Ligand for the Growth Hormone Secretagogue Receptor *The Journal of Biological Chemistry* **275**:21995-22000.
51. Howard A D, Feighner S D, Cully D F, Arena J P, Liberators P L, Rosenblum C I, Hamelin M, Hreniuk D L, Palyha O C, Anderson, J, Paress P S, Diaz C, Chou M, Liu K K, McKee K K, Pong S-S, Chaung L-Y, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji D, Dean D C, Melillo D G, Patchett A A, Nargund R, Griffin P R, DeMartino J A, Gupta S K, Schaeffer J A, Smith R G, Van der Ploeg L H T (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release *Science* **273**:974-977.
52. Huber P E, Pfisterer P (2000) In vitro and in vivo transfection of plasmid DNA in the Dunning prostate tumor R3327-AT1 is enhanced by focused ultrasound *Gene Therapy* **7**:1516-25.
53. Ibáñez M, Gariglio P, Chávez P, Santiago R, Wong C, Baeza I (1996) Spermidine-condensed DNA and cone-shaped lipids improve delivery and expression of exogenous DNA transfer by liposomes *Biochemical Cell Biology* **74**:633-43.
54. Jacobowitz D M, Schulte H, Chrousos G P, Loriaux D L (1983) Localization of GRF-Like Immunoreactive Neurons in the Rat Brain *Peptides* **4**:521-4.
55. Kaiser U B (2001) Editorial: Pituitary gene Therapy-Hypotheses on Hypophysis *Endocrinology* **142**:528-31.
56. Kaji H, Kishimoto M, Kirimura T, Iguchi G, Murata M, Yoshioka S, Iida K, Okimura Y, Yoshimoto Y, Chihara K (2001) Hormonal Regulation of the Human Ghrelin Receptor Gene Transcription *Biochemical and Biophysical Research Communication* **284**:660-6.
57. Kempainen R J, Clark T P, Sartin J L, Zerbe C A (1992) Regulation of adenocorticotropin secretion from cultured canine anterior pituitary cells *Journal of Veterinary Research* **53**:2355-2358.

58. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**:656-660.
59. Kojima M (2000) Ghrelin is a novel growth hormone releasing acylated peptide from stomach (Abstract). *Third International Symposium on Growth Hormone Secretagogues*, Keyston, CO, Feb 17-19, 2000, dans Bednarek M A, Feighner S D, Pong S-S, McKee K K, Hreniuk D L, Silva M V, Warren V A, Howard A D, Van der Ploeg L H Y, Heck J V (2000) Structure-Function Studies on the New Growth Hormone-Releasing Peptide, Ghrelin: Minimal Sequence of Ghrelin Necessary for Activation of Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a. *Journal of Medicinal Chemistry* **43**:4370-4376.
60. Kojima M, Hosoda H, Masuo H, Kangawa K (2001) ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* **12**:118-22.
61. Kuriyama S, Mitoro A, Tsujinoue H, Nakatani T, Yoshiji H, Tsujimoto T, Yamazaki M, Fukui H (2000) Particle-mediated gene transfer into murine livers using a newly developed gene gun *Gene Therapy* **7**:1132-6.
62. Lall S, Tung L Y C, Ohlsson C, Jansson J-O, Dickson S L (2001) Growth Hormone (GH)-Independent Stimulation of adiposity by GH Secretagogues *Biochemical and Biophysical Research Communications* **280**:132-138.
63. Lasic D D (1997) Liposomes in gene delivery *CRC Press LLC*, Boca Raton, Florida, USA.
64. Lawrie A, Brisken A F, Francis S E, Cumberland D C, Crossman D C, Newman C M (2000) Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery *Gene Therapy* **7**:2023-7.
65. Li S, MacLaughlin F C, Fewell J G, Il Y, Mehta V, French M F, Nordstrom J L, Coleman M, Belagali N S, Schwartz R J, Smith L C (1999) Increased level and duration of expression in muscle by co-expression of a transactivator using plasmid systems *Gene Therapy* **6**:2005-11.
66. Li X, Eastman E M, Schwartz R J, Draghia-Akli R (1999) Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences *Nature Biotechnology* **17**:241-5.
67. Liu F, Song Y K, Liu D (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy* **6**:1258-1266.

68. Marmary Y, Parlow A F, Goldsmith C M, He X, Wellner R B, Satomura K, Kriete M F, Gehron Robey P, Nieman L K, Baum B J (1999) Construction and *In Vivo* Efficacy of a Replication-Deficient Recombinant Adenovirus Encoding Murine Growth Hormone *Endocrinology* **140**:260-5.
69. Maruyama H, Sugawa M, Moriguchi Y, Imazeki I, Ishikawa Y, Ataka K, Hasegawa S, Ito Y, Higuchi N, Kazama J J, Gejyo F, Miyazaki J-I (2000) Continuous Erythropoietin Delivery by Muscle-Targeted Gene Transfer Using *in Vivo* Electroporation *Human Gene Therapy* **11**:429-37.
70. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K (2000) Ghrelin Stimulates Gastric Acid Secretion and Motility in Rats *Biochemical and Biophysical Research Communication* **276**:905-8.
71. Mathiesen I (1999) Electropermeabilization of skeletal muscle enhances gene transfer *in vivo* *Gene Therapy* **6**:508-14.
72. Matsumoto M, Kitajima Y, Iwanami T, Hayashi Y, Tanaka S, Minmitake Y, Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K (2001) Structural Similarity of Ghrelin Derivatives to Peptidyl Growth Hormone Secretagogues *Biochemical and Biophysical Research Communication* **284**:655-9.
73. Mehigh C S, Elias V D, Mehigh R J, Helferich W G, Tucker H A (1993) Development of a Recombinant Bovine Leukemia Virus Vector for Delivery of a Synthetic Bovine Growth Hormone-Releasing Factor Gene into Bovine Cells. *Journal of Animal Sciences* **71**:687-693.
74. Mir L M, Bureau M F, Rangara R, Schartz B, Scherman D (1998) Long-term, high level *in vivo* gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences à Paris, Sciences de la vie / Life Sciences* **321**:893-899.
75. Mir L M, Bureau M F, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud J-M, Delaere P, Branellac D, Schwartz B, Scherman D (1999) High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses *Proceedings of the National Academia of Sciences. USA* **96**:4262-7.
76. Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasy H, Yahata K, Mykoyama M, Sugawara A, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2000) Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin *FEBS* **486**:213-6.

77. Muccioli G, Papotti M, Locatelli V, Ghigo E, Deghenghi R (2001) Binding of 125I-labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland *Journal of Endocrinological Investigation* **24** (3):RC7-9.
78. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding *Nature* **409**:194-8.
79. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagashi M, Hosoda H, Oya H, Hayashi Y, Kangawa K (2001) Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers *American Journal of Physiology and Regulatory Integrative Comp. Physiology* **280**:R1483-7.
80. Olsen K R (1983) The quinoxaline decapeptide antibiotics. dans *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*; Weinstein B, Ed.; Macel Dekker, Inc.: New York and Basel, 7:1-33, dans Bednarek M A, Feighner S D, Pong S-S, McKee K K, Hreniuk D L, Silva M V, Warren V A, Howard A D, Van der Ploeg L H Y, Heck J V (2000) Structure-Function Studies on the New Growth Hormone-Releasing Peptide, Ghrelin: Minimal Sequence of Ghrelin Necessary for Activation of Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a. *Journal of Medicinal Chemistry* **43**:4370-4376.
81. Papotti M, Ghè P, Cassoni P, *et al.* (2000) Growth hormone secretagogue (GHS) binding sites in peripheral human tissues *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **85**:3803-3807.
82. Peino R, Baldelli R, Rodriguez-Garcia J, Rodriguez-Segade S, Kojima M, Kangawa K, Arvat E, Ghigo E, Dieguez C, Cadanueva F F (2000) Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans *European Journal of Endocrinology* **143**:R11-4.
83. Pierce Chemical, Documents # 0692 et # 0485 des instructions pour Iodo-Gen[®], Pierce Chemical, Rockford, Ill, USA.
84. Pursel V G, Hammer R E, Bolt D J, Palmiter R D, Brinster R L (1990) Integration, expression and germ-line transmission of growth related genes in pigs *Journal of Reproduction and Fertility, Suppl.* **41**:77-87.
85. Pursel V G, Wall R J, Solomon M B, Bolt D J, Murray J E, Ward K A (1997) Transfer of an ovine metallothionein-ovine growth hormone fusion gene into swine *Journal of Animal Science* **75**:2208-14.

86. Resh M D (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targetting of myristoylated and palmitoylated proteins *Biochem. Biophys. Acta.* **1451**:1-16, dans Kojima M, Hosoda H, Masuo H, Kangawa K (2001) ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* **12**:118-22..
87. Rivier J, Spiess J, Thorner M, Vale W (1982) Characterisation of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour *Nature* **300**:276-8.
88. Rizzuto G, Cappelletti M, Maione D, Savino R, Lazzaro D, Costa P, Mathiesen I, Cortese R, Ciliberto G, Laufer R, La Monica N, Fattori E (1999) Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation *Medical Sciences* **96**:6417-22.
89. Rizzuto G, Cappelletti M, Mennuni C, Wiznerowicz M, DeMartis A, Maione D, Ciliberto G, La Monica N, Fattori E (2000) Gene Electrotransfer Results in a High-Level Transduction of Rat Skeletal Muscle and Corrects Anemia of Renal Failure *Human Gene Therapy* **11**:1181-1900.
90. Roelfsema F, Biermasz N R, Groote Veldman R, Veldhuis J D, Frölich M, Srokovskis Brantsma W H, Wit J-M (2001) Growth Hormone (GH) Secretion in Patients with an Inactivating Defect of the GH-Releasing Hormone (GHRH) Receptor Is Pulsatile: Evidence for a Role for Non-GHRH Inputs into the Generation of GH Pulses *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86**:2459-64.
91. Seoane L M, Tovar S, Baldelli R, Arvat E, Ghigo E, Casanuava F F, Dieguez C (2000) Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats *European Journal of Endocrinology* **143**:R7-9.
92. Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2001) 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* **50**:227-232.
93. Smith R G, Feighner S, Prendergast K, Guan X, Howard A (1999) A New Orphan Receptor Involved in Pulsatile Growth Hormone Release. *Trends in Endocrinological Metabolism* **10**:128-135.
94. Song Y K, Liu F, CHU S, Liu D (1997) Characterization of Cationic Liposome-Mediated Gene Transfer In Vivo by Intravenous Administration. *Human Gene Therapy* **8**:1585-1594.

95. Song Y K, Liu F, Liu D (1998) Enhanced gene expression in mouse lung by prolonging the retention time of intravenously injected plasmid DNA *Gene Therapy* **5**:1531-7.
96. Spier AD, de Lecea L (2000) Cortistatin: a member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions *Brain Res. Brain Res. Rev.* **33**:228-41.
97. Svensson E C, Black H B, Dugger D L, Tripathy S K, Goldwasser E, Hao Z, Chu L, Leiden J M (1997) Long-Term Erythropoietin Expression in Rodents and Non-Human Primates Following Intramuscular Injection of a Replication-Defective Adenoviral Vector *Human Gene Therapy* **8**:1797-1806.
98. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yochimoto Am Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamixu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2000) Ghrelin Strongly Stimulates Growth Hormone (GH) Release in Humans *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **85**:4908-11.
99. Tannenbaum G S, Ling N (1984) The interrelationship of growth hormone releasing factor and somatostatin in generation og the ultradian rythm of growth hormone secretion *Endocrinology* **115**:1952-7.
100. Titomirov A V, Sukharev S, Kistanova E (1991) In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA *Biochim. Biophys. Acta.* **1088**:131-4 dans Aihara H, Miyazaki J-I (1998) Gene transfer into muscle by electroporation in vivo *Nature Biotechnology* **16**:867-70.
101. Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, Rio M-C, Epelbaum J, Bluet-Pajot M-T (2001) In vivo and in vitro Effects of Ghrelin/Motilin-Related Peptide on Growth Hormone Secretion in the Rat *Neuroendocrinology* **73**:54-61.
102. Tomasetto C, Karam SM, Ribiera S, Masson R, Lefèbre O, Staub A, Alexander G, Chenard M-P, Rio M-C (2000) Identification and Characterization of a novel gastric peptide hormone: the motilin-related peptide *Gastroenterology* **119**:395-405.
103. Tripathy S K, Black H B, Goldwasser E, Leiden J M (1996) Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors *Nature Medicine* **5**:545-50.

104. Tschöp M, Smiley D L, Helman M L (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents *Nature* **407**:908-13.
105. Vicat J M, Boisseau S, Jourdes P, Lainé M, Wion D, Bouali-Benazzouz R, Benabid A L, Berger F (2000) Muscle Transfection by Electroporation with High-Voltage and Short-Pulse Currents Provides High-Level and Long Lasting Gene Expression *Human Gene Therapy* **11**:909-16.
106. Wells J M, Li L H, Sen A, Jahreis G P, Hui W S (2000) Electroporation-enhanced gene delivery in mammary tumors *Gene Therapy* **7**:541-7.
107. Widera G, Austin M, Rabussay D, Goldbeck C, Barnett S W, Chen M, Leung L, Otten G R, Thudium K, Selby M J, Ulmer J B (2000) Increased DNA Vaccine Delivery and Immunogenicity by Electroporation In Vivo *Journal of Immunology* **164**:4635-40.
108. Wolff J A, Malone R W, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner P L (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo *Science* **247**:1465-8.
109. Wolff J A, Lederberg J (1994) An early history of gene transfer and therapy *Human Gene Therapy* **5**:469-80.
110. Wren A M, Small C J, Ward H L, Murphy K G, Dakin C L, Taheri S, Kennedy A R, Roberts G H, Morgan D G A, Ghatei M A, Bloom S R (2000) The Novel Hypothalamic Peptide Ghrelin Stimulates Food Intake And Growth Hormone Secretion *Endocrinology* **141**:4325-8.
111. Xuyang L, Eastman E M, Schwartz R J, Draghia-Akli R (1999) Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences *Nature Biotechnology* **17**:241-5.
112. Zhang G, Song Y K, Liu D (2000) Long-term expression of human alpha1-antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure *Gene Therapy* **7**:1344-9.