

Université de Montréal

**Régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ via
l'activation des récepteurs CD36 et GHS-R1a :
Potentiel anti-athérosclérotique**

par

Annie Demers

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

16 octobre 2009

© Annie Demers, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ via l'activation des récepteurs CD36 et
GHS-R1a : Potentiel anti-athérosclérotique

présentée par :

Annie Demers

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Lévesque, président-rapporteur
Huy Ong, directeur de recherche
André Tremblay, co-directeur
Martin Sirois, membre du jury
Frédéric Picard, examinateur externe
Yahye Merhi, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les secrétines peptidiques de l'hormone de croissance (GHRPs) constituent une classe de peptides synthétiques capables de stimuler la sécrétion de l'hormone de croissance (GH). Cette activité est médiée par leur liaison à un récepteur couplé aux protéines G : le récepteur des secrétines de l'hormone de croissance (GHS-R1a), identifié subséquemment comme le récepteur de la ghréline. La ghréline est un peptide de 28 acides aminés sécrété principalement par les cellules de la muqueuse de l'estomac, qui exerce de nombreux effets périphériques indépendamment de la sécrétion de l'hormone de croissance. Les effets indépendants de la sécrétion de GH incluent, entre autres, des actions sur le contrôle de la prise de nourriture, le métabolisme énergétique, la fonction cardiaque, le système immunitaire et la prolifération cellulaire. L'étude de la distribution périphérique des sites de liaison des GHRPs nous a permis d'identifier un second site, le CD36, un récepteur scavenger exprimé dans plusieurs tissus dont le myocarde, l'endothélium de la microvasculature et les monocytes/macrophages. Le CD36 exprimé à la surface du macrophage joue un rôle clé dans l'initiation du développement de l'athérosclérose par la liaison et l'internalisation des lipoprotéines de faible densité oxydées (LDLox) dans l'espace sous-endothélial de l'artère.

L'hexaréline, un analogue GHRP, a été développé comme agent thérapeutique pour stimuler la sécrétion de l'hormone de croissance par l'hypophyse. Sa propriété de liaison aux récepteurs GHS-R1a et CD36 situés en périphérie et particulièrement sa capacité d'interférer avec la liaison des LDLox par le CD36 nous ont incité à évaluer la capacité de

l'hexaréline à moduler le métabolisme lipidique du macrophage. L'objectif principal de ce projet a été de déterminer les effets de l'activation des récepteurs CD36 et GHS-R1a, par l'hexaréline et la ghréline, le ligand endogène du GHS-R1a, sur la physiologie du macrophage et de déterminer son potentiel anti-athérosclérotique.

Les résultats montrent premièrement que l'hexaréline et la ghréline augmentent l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1, impliqués dans le transport inverse du cholestérol, via un mécanisme contrôlé par le récepteur nucléaire PPAR γ . La régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ par l'activation des récepteurs CD36 et GHS-R1a se fait indépendamment de la présence du domaine de liaison du ligand (LBD) de PPAR γ et est consécutive de changements dans l'état de phosphorylation de PPAR γ . Une étude plus approfondie de la signalisation résultant de la liaison de la ghréline sur le GHS-R1a révèle que PPAR γ est activé par un mécanisme de concertation entre les voies de signalisation G α q/PI3-K/Akt et Fyn/Dok-1/ERK au niveau du macrophage. Le rôle de PPAR γ dans la régulation du métabolisme lipidique par l'hexaréline a été démontré par l'utilisation de macrophages de souris hétérozygotes pour le gène de *Ppar gamma*, qui présentent une forte diminution de l'activation des gènes de la cascade métabolique PPAR γ -LXR α -transporteurs ABC en réponse à l'hexaréline. L'injection quotidienne d'hexaréline à un modèle de souris prédisposées au développement de l'athérosclérose, les souris déficientes en apoE sous une diète riche en cholestérol et en lipides, se traduit également en une diminution significative de la présence de lésions athérosclérotiques correspondant à une

augmentation de l'expression des gènes cibles de PPAR γ et LXR α dans les macrophages p \acute{e} riton \acute{e} aux provenant des animaux trait \acute{e} s \grave{a} l'hexar \acute{e} line.

L'ensemble des r \acute{e} sultats obtenus dans cette th \acute{e} se identifie certains nouveaux m \acute{e} canismes impliqu \acute{e} s dans la r \acute{e} gulation de PPAR γ et du m \acute{e} tabolisme du cholest \acute{e} rol dans le macrophage via les r \acute{e} cepteurs CD36 et GHS-R1a. Ils pourraient servir de cibles th \acute{e} rapeutiques dans une perspective de traitement des maladies cardiovasculaires.

Mots-cl \acute{e} s : Akt, ath \acute{e} roscl \acute{e} rose, CD36, Fyn, ghr \acute{e} line, GHRP, GHS-R1a, hexar \acute{e} line, LDLox, LXR α , MAPK/ERK, PPAR γ , transporteur ABCA1, transporteur ABCG1.

Abstract

Growth hormone-releasing peptides (GHRPs) are a class of small synthetic peptides known to stimulate GH release through their binding to a G protein-coupled receptor identified as GHS-R1a, later recognized as the ghrelin receptor. Ghrelin is an acetylated 28 amino acid hormone initially identified from the stomach, which induces the release of growth hormone (GH) from the pituitary but also regulates food intake, energy homeostasis, cardiovascular function, immune system and cell proliferation. In documenting the peripheral distribution of GHRPs binding sites, we uncovered the presence of another binding site for GHRPs, identified as CD36, a class B scavenger receptor. CD36 is expressed among several tissues, including myocytes, endothelial cells of the microvasculature and monocytes/macrophages. The macrophage CD36 contributes to excessive lipid loading and atherogenic formation of foam cells through uptake of oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) in the subendothelial space of the artery. The properties of hexarelin, a ligand for GHS-R1a and CD36, which features overlapping binding sites with that of oxLDL binding domain on CD36, and thus interfering with the binding of oxLDL on CD36, have prompted us to evaluate the potential of hexarelin, as well as that of the endogenous ligand ghrelin in the modulation of macrophage cholesterol metabolism.

We demonstrate here the ability of hexarelin and ghrelin to enhance the expression of ATP-binding cassette A1 and G1 transporters through a PPAR γ -dependent mechanism. The hormone binding domain of PPAR γ is not required to mediate PPAR γ transcriptional

activation by CD36 and GHS-R1a. Both hexarelin and ghrelin promotes phosphorylation of PPAR γ in THP-1 macrophages. A more detailed study of GHS-R1a-initiated signaling revealed an intricate and complex signalling interplay triggered by ghrelin that involves modulation of Src-dependent Dok-1/ERK1/2 and Src-independent G α q/PI3-K/Akt pathways, leading to PPAR γ -dependent transcriptional competence in the macrophages. The central role of PPAR γ on cholesterol metabolism in the macrophages has been demonstrated using peritoneal macrophages from PPAR γ heterozygote mice whose response to hexarelin on PPAR γ -LXR α -ABC transporters pathway was strongly impaired. Treatment of apolipoprotein E-null mice fed on a lipid-rich diet with hexarelin resulted in a significant reduction in atherosclerotic lesions, concomitant with an enhanced expression of PPAR γ and LXR α target genes in peritoneal macrophages.

The results presented in this thesis feature novel mechanisms by which the beneficial regulation of PPAR γ and cholesterol metabolism in macrophages could be regulated by both CD36 and ghrelin receptor. The downstream effects following the activation of these receptors might be potential targets in the treatment of human coronary artery disease.

Keywords : Akt, atherosclerosis, CD36, Fyn, ghrelin, GHRP, GHS-R1a, hexarelin, oxLDL, LXR α , MAPK/ERK, PPAR γ , ABCA1, ACBG1.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	vi
Table des matières.....	viii
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xiv
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements	xxi

Chapitre 1, 2 et 3 : Revue de littérature.....	1
--	---

1 Les secrétines de l'hormone de croissance.....	2
---	----------

1.1 Les secrétines peptidiques de l'hormone de croissance (GHSs) : de la Met-enképhaline à l'hexaréline.....	2
--	---

1.2 Le récepteur des GHSs est un récepteur distinct.....	4
--	---

1.3 Identification et caractérisation des récepteurs GHSs.....	5
--	---

1.3.1 Distribution du GHS-R1a.....	9
------------------------------------	---

1.3.2 Voies de signalisation impliquées dans l'activation du GHS-R1a.....	11
---	----

1.3.2.1 La voie classique.....	13
--------------------------------	----

1.3.3 Le GHS-R1a est constitutivement actif.....	14
--	----

1.3.4 L'endocytose du GHS-R1a	16
-------------------------------------	----

1.3.5 Homo- et hétéro-oligomérisation du GHS-R1a	17
--	----

1.3.5.1 Homo-oligomérisation GHS-R1a/GHS-R1b	17
--	----

1.3.5.2 Hétéro-oligomérisation avec le récepteur de la dopamine	17
---	----

1.3.5.3 Hétéro-oligomérisation avec le récepteur des prostanoïdes.....	18
--	----

1.4 Identification du ligand naturel du GHS-R1a : la ghréline	19
---	----

1.5 Activités biologiques de la ghréline.....	21
---	----

1.5.1 Effets neuroendocrines de la ghréline	23
---	----

1.5.1.1 Mécanisme impliqué dans l'activité neuroendocrinienne de la ghréline ...	23
--	----

1.5.2	Action orexigène et sur l'obésité.....	24
1.5.3	Action de la ghréline sur le métabolisme énergétique	27
1.5.3.1	Le métabolisme des lipides	27
1.5.3.2	Le métabolisme du glucose.....	28
1.5.3.3	Mécanisme d'action de la suppression de sécrétion d'insuline par la ghréline dans le pancréas	29
1.5.4	Action cardiovasculaire.....	31
1.5.5	Effets immunomodulateurs	32
1.5.5.1	Action anti-inflammatoire de la ghréline	32
1.5.6	Effet sur la prolifération : implication de la ghréline dans le cancer	33
1.5.6.1	Activation de la voie des MAPKs dans l'effet prolifératif de la ghréline.....	34
1.5.7	Autres effets de la ghréline	36
1.6	Les souris déficientes en ghréline et en GHS-R1a.....	37
1.7	Hétérogénéité de la ghréline et de son récepteur	38
1.8	Ciblage thérapeutique du GHS-R1a et de la ghréline	39
2	Une autre cible des GHSs : Le récepteur CD36	41
2.1	Distribution tissulaire du CD36	42
2.2	Propriétés moléculaires du CD36.....	43
2.3	Implication particulière de CD36 dans le développement de l'athérosclérose	48
2.3.1	La formation des lésions athéromateuses.....	48
2.3.2	Implication du CD36 dans le développement de l'athérosclérose	51
2.3.3	Nature de l'interaction LDLox-CD36.....	52
2.3.4	Voies de signalisation activées par la liaison du LDLox sur le CD36.....	53
2.4	La régulation de l'expression du CD36	55
2.5	Les effets métaboliques de la variation de l'expression du CD36.....	58
2.5.1	La déficience en CD36 chez l'humain	58
3	Le récepteur nucléaire PPARγ	59

3.1	Les différents isoformes de PPAR γ et leur patron d'expression.....	60
3.2	Structure de PPAR γ	61
3.3	Hétérodimérisation avec RXR et liaison à l'ADN.....	63
3.4	Régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ	64
3.4.1	Les ligands naturels de PPAR γ	65
3.4.2	Les ligands synthétiques de PPAR γ	65
3.4.2.1	Les modulateurs sélectifs de PPAR γ (SPPAR γ Ms).....	66
3.4.2.2	Les antagonites de PPAR γ	67
3.4.2.3	Effet synergique des ligands de PPAR γ et RXR.....	67
3.5	Interaction avec les cofacteurs	68
3.5.1	Les coactivateurs.....	70
3.5.2	Les corépresseurs	72
3.6	Régulation par des modifications post-traductionnelles	73
3.6.1	La phosphorylation.....	73
3.6.2	L'ubiquitination.....	75
3.6.3	La sumoylation.....	76
3.6.4	La nitration	77
3.6.5	Activité non-génomique de PPAR γ : rôle dans la régulation de l'inflammation.....	77
3.7	Rôles de PPAR γ	79
3.7.1	PPAR γ , l'adipogenèse et le stockage des acides gras	79
3.7.2	Rôle de PPAR γ et du CD36 dans le métabolisme lipidique du macrophage	81
3.7.2.1	Régulation de l'efflux de cholestérol du macrophage par PPAR γ	82
3.7.3	Rôle de PPAR γ dans l'inflammation	84
3.7.4	PPAR γ et la sensibilité à l'insuline	85
3.7.5	Rôle novateur du macrophage dans la sensibilité à l'insuline	87
4	Problématique et objectifs des travaux.....	89

Chapitre 5 et 6 : Résultats	91
Publications à titre de premier auteur.....	92
Publications à titre de coauteur	92
Chapitre 5 : L’hexaréline et le macrophage	94
A Growth Hormone-Releasing Peptide that Binds Scavenger Receptor CD36 and Ghrelin Receptor Upregulates ABC Sterol Transporters and Cholesterol Efflux in Macrophages Through a PPAR γ -dependent Pathway	95
Avant-Propos.....	96
Résumé	98
Summary	99
Introduction.....	101
Results.....	104
Discussion	114
Materials and methods	120
Acknowledgments.....	126
References.....	127
Figure Legends.....	136
Figures.....	142
Chapitre 6 : La ghréline et le macrophage	150
A Concerted Kinase Interplay Identifies PPAR γ as a Molecular Target of Ghrelin Signaling in Macrophages.....	151
Avant-Propos.....	152
Résumé	153
Summary	154
Introduction.....	156
Results.....	159
Discussion	169
Materials and methods	175

Acknowledgments.....	178
Figure legends.....	187
Figures.....	193
Chapitre 7, 8 et 9 : Discussion générale, perspectives et conclusions.....	201
7 Processus impliqués dans le contrôle du métabolisme lipidique du macrophage par l'activation des récepteurs CD36 et GHS-R1a.....	202
7.1 L'hexaréline protège les souris du développement des lésions athérosclérotiques.....	203
7.2 Le transport inverse du cholestérol par la cascade PPAR γ -LXR α - transporteurs ABC.....	204
7.3 Avantages et inconvénients du traitement à l'hexaréline.....	207
7.3.1 L'inhibition de la boucle auto-régulatrice entre PPAR γ et CD36.....	208
7.3.2 L'interaction particulière entre l'hexaréline et le CD36.....	210
7.4 Particularités de la régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ par CD36 et GHS-R1a.....	211
7.4.1 L'activation de PPAR γ par la ghréline est dépendante de Akt.....	212
7.4.2 La phosphorylation de PPAR γ	213
7.4.3 Le rôle des MAPKs dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ par la ghréline.....	214
7.4.4 Restriction de la phosphorylation de S84 par la ghréline.....	216
7.5 Fyn : un intégrateur du métabolisme lipidique.....	218
7.6 Coopération pour la régulation de PPAR γ	219
7.6.1 Coopération entre Akt et ERK1/2.....	219
7.6.2 L'intégration des signaux de l'AF-1 par le LBD PPAR γ	220
7.6.3 Le rôle de CD36 dans la transduction du signal.....	222
8 Perspectives.....	224
8.1 Contribution du récepteur de la ghréline dans l'effet anti-athérosclérotique des GHRPs.....	224

8.1.1 L'interaction CD36-GHS-R1a ?	225
8.2 Mécanismes d'interaction des cofacteurs de PPAR γ suite à l'activation du CD36 et du GHS-R1a.....	226
8.3 Profil d'expression des médiateurs inflammatoires	227
9 Conclusions générales	227
Bibliographie	229

Liste des tableaux

Tableau I : Distribution du GHS-R1a	10
Tableau II : Voies de signalisation modulées par la ghréline	11
Tableau III : Effets physiologiques de la ghréline	22
Tableau IV : Régulation de l'expression du CD36	57
Tableau V : Les corégulateurs de PPAR γ	71

Liste des figures

Figure 1 : Les sécrétines peptidiques.....	4
Figure 2 : Alignement dendogramme du récepteur de la ghréline avec d'autres GPCRs.....	6
Figure 3 : (A) Structure du gène <i>Ghs-r1a</i> (B) Représentation serpentine et hélicale du GHS-R1a.....	8
Figure 4 : Signalisation classique du récepteur de la ghréline.....	14
Figure 5 : Résidus impliqués dans l'activation du GHS-R1a.....	15
Figure 6 : L'hétérodimérisation GHS-R1a/DR1.....	18
Figure 7 : Le gène de la prépro-ghréline.....	21
Figure 8 : Mécanisme d'action de la ghréline sur la sécrétion de l'hormone de croissance.....	24
Figure 9 : Mécanismes d'action de l'effet orexigène de la ghréline.....	26
Figure 10 : Actions de la ghréline sur les cellules pancréatiques.....	30
Figure 11 : Régulation de la voie des MAPKs par la ghréline.....	35
Figure 12 : Représentation schématique du gène <i>Cd36</i>	44
Figure 13 : Représentation schématique du CD36 et de ses sites de liaison.....	46
Figure 14 : Effets des LDLox sur le macrophage via le CD36.....	54
Figure 15 : Représentation schématique de PPAR γ	61
Figure 16 : Structure de la poche de liaison de PPAR γ	63
Figure 17 : L'hétérodimérisation de PPAR avec RXR.....	64
Figure 18 : Initiation de la transcription par PPAR γ	69
Figure 19 : La régulation de PPAR γ par phosphorylation.....	75
Figure 20 : Mécanisme de transrépression par PPAR γ sumoylé.....	77
Figure 21 : PPAR γ et la fonction adipocytaire.....	80
Figure 22 : La régulation de l'efflux de cholestérol par PPAR γ	83
Figure 23 : Effets anti-diabétogènes des TZDs.....	87
Figure 24 : La régulation du métabolisme lipidique du macrophage.....	205
Figure 25 : La régulation de l'activité de PPAR γ par le récepteur de la ghréline.....	215
Figure 26 : Les mécanismes de signalisation athérogènes.....	223

Liste des abréviations

15dPGJ2	15-désoxy- Δ 12-14-prostaglandine J2
aa	acide aminé
ABC	transporteur à cassette liant l'ATP
AC	adénylate cyclase
ACC	acétyl-CoA carboxylase
ACS	acétyl-CoA synthase
ACTH	hormone corticotrope
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	adénosine diphosphate
AF	fonction d'activation
AG	acide gras
AGE	produit terminal de glycation
AGL	acide gras libre
AgRP	peptide apparenté à la protéine Agouti
AMPc	adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
AMPK	kinase activée par l'adénosine 3',5'-monophosphate
aP2	protéine 2 de liaison des acides gras
Apo	apolipoprotéine
ARA70	protéine 70 associée au récepteur des androgènes
ARNm	acide ribonucléique messenger
ASK-1	kinase 1 régulatrice du signal de l'apoptose
ATP	adénosine triphosphate
BAF60c	sous-unité 2 du facteur de transcription de 60 kDa associé à BRG1/Brm
bFGF	facteur de croissance basique des fibroblastes
BRET	transfert d'énergie en bioluminescence
BRG1/Brm	gène 1 relié à brahma
C/EBP	protéine fixant enhancer CCAAT

Cdk7	kinase 7 dépendante de la cycline
CBP	protéine de liaison CREB
Ch	cholestérol
CoA	coactivateur
CoR	corépresseur
COX	cyclooxygénase
CPT1	carnitine palmitoyltransférase-1
CREB	protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc
DAG	diacylglycérol
DBD	domaine de liaison à l'ADN
DGAT	<i>O</i> -acyltransférase du diacylglycérol
DR	récepteur de la dopamine
EGF	facteur de croissance épidermique
eNOS	oxide nitrique synthase endothéliale
ERK	kinase régulée par signal extracellulaire
FABP	protéine liant les acides gras
FAS	synthase des acides gras
FATP1	protéine de transport des acides gras
FXR	récepteur farnésoïde X
GABA	acide gamma-amino butyrique
GH	hormone de croissance
GHRH	somatolibérine
GHRP	peptide sécréteur de GH
GHS	sécrétagogue de l'hormone de croissance
GHS-R1a, b	récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance de type 1a, b
GM-CSF	facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GOAT	<i>O</i> -acétyltransférase de la ghréline
GPCR	récepteur couplé aux protéines G

GPDH	déhydrogénase du glycérol-3-phosphate
GyK	glycérol kinase
HAT	acétyltransférase des histones
HDAC	histone désacétylase
HDL	lipoprotéines de haute densité
HETE	hydroxyeicosatétranoïque
HIF-1	facteur 1 induit par l'hypoxie
HMGB1	High-Mobility Group Box 1
HMT	méthyltransférase des histones
HODE	acide hydroxyoctadécadiénoïque
HRP	peroxidase du raifort (horseradish)
HSL	lipase hormono-sensible
HSP	protéine de choc thermique
ICAM	molécule d'adhérence intracellulaire
IL	interleukine
IP ₃	inositol (1,4,5) triphosphate
IRS	substrat du récepteur de l'insuline
JNK	kinase du N-terminal de c-Jun
kDa	kilo dalton
KO	déléte pour (Knock out)
LBD	domaine de liaison du ligand
LDL _{ox}	lipoprotéine de faible densité oxydée
LH	hormone lutéinisante
LMO4	protéine 4 ayant seulement des domaines LIM
LPL	lipoprotéine lipase
LPS	lipopolysaccharide
LXR	récepteur X du foie
MAPK	protéine kinase activée par les mitogènes
MBOAT	<i>O</i> -acétyltransférase liée à la membrane

MCP-1	protéine-1 chimiotactique du macrophage
MCS-F	facteur stimulant des colonies de macrophages
MEK	mitogen-activated/extracellular signal regulated kinase, MAP kinase kinase
NCoA6	coactivateur 6 des récepteurs nucléaires
NCoR	répresseur du récepteur nucléaire
Nf- κ B	facteur nucléaire kappa B
NOS	synthase de l'oxyde nitrique
NPY	neuropeptide Y
p/CIP	protéine interagissant avec p300/CBP
PBP	protéine de liaison de PPAR γ
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEPCK	carboxykinase phosphoenolpyruvate
PGC-1	coactivateur de PPAR γ
PI3-K	kinase-3 phosphoinositides
PIP ₂	phosphatidyl inositol diphosphate
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
POMC	proopiomélanocortine
PPAR	récepteur activé par les proliférateurs des peroxisomes
PPRE	élément de réponse de PPAR
PRIC285	cofacteur interagissant avec PPAR α
PTX	toxine pertussis
RAR	récepteur de l'acide rétinoïque
Rb	protéine du rétinoblastome
RE	réticulum endoplasmique
RIP140/160	protéine 140/160 d'interaction du récepteur
ROS	espèce réactive de l'oxygène
ROS	fragments du segment externe des bâtonnets

RXR	récepteur X des rétinoïdes
SCD-1	désaturase-1 du stéaroyl CoA
SCF	facteur de cellules souches
SHP	petit partenaire d'hétérodimère
SMRT	médiateur silencieux des rétinoïdes et de l'hormone thyroïdienne
SNC	système nerveux central
SNP	polymorphisme de nucléotide unique
SP-A	[^D -Arg ¹ , ^D -Phe ⁵ , ^D -Trp ^{7,9} , Leu ¹¹] substance P
SPPAR γ M	modulateur sélectif de PPAR γ
SR-BI	récepteur scavenger de type BI
SRC	coactivateurs des récepteurs stéroïdiens
SREBP	protéine se liant à l'élément de réponse des stérols
STAT	signal activateur de transcription
SUMO	small ubiquitin-like modifier
TBL1	transducine β -like 1
TBL1R	protéine liée à TBL1
TGF- β	facteur de croissance transformant β
TIF2	facteur transcriptionnel intermédiaire 2
TLR	Toll-Like Receptor
TM	transmembranaire
TNF- α	facteur de nécrose tumorale- α
TRIP3	protéine interagissant avec le récepteur de l'hormone thyroïdienne
TSP-1	thrombospondine-1
TXA ₂	thromboxane A ₂
TZD	thiazolidinediones
UCP	protéine découplante mitochondriale
VCAM	molécule d'adhérence des cellules vasculaires

À tous ceux que j'aime

Milles mercis pour votre soutien indéfectible

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mes directeurs de thèse, les Drs Huy Ong et André Tremblay. Je remercie Dr Tremblay, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et accompagné lors de développement de ce projet. Je le remercie pour sa confiance. Je remercie Dr Ong pour sa disponibilité, sa rigueur en recherche et son intégrité. Je tiens aussi à remercier nos collaborateurs Sylvie Marleau et Walter Wahli pour leur soutien.

Je tiens à remercier chaleureusement mes collègues, et amies, de laboratoire au centre de recherche du CHU Ste-Justine, Amélie Rodrigue Way, Karine Sauvé, Mélanie Sanchez, Nathalie Picard et Véronique Caron, qui par leur amabilité et leur bonne humeur créent un environnement de travail stimulant et plus qu'agréable. Je tiens à souligner la gentillesse et l'excellence de l'ensemble des membres de la faculté de Pharmacie et du CHU Ste-Justine.

Je tiens à souligner l'aide financière des organismes IRSC et Rx&D, ainsi que la faculté de Pharmacie et la FES pour les bourses d'études dont j'ai bénéficiées tout au long de mon doctorat. Merci particulier aux membres du jury d'accepter d'évaluer cette thèse.

Finalement, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma famille et particulièrement à Carl pour les précieux encouragements prodigués tout au long de mes études et plus particulièrement dans les moments difficiles.

Chapitre 1, 2 et 3 : Revue de littérature

1 Les sécrétines de l'hormone de croissance

1.1 Les sécrétines peptidiques de l'hormone de croissance (GHSs) : de la Met-enképhaline à l'hexaréline

L'histoire des sécrétines de l'hormone de croissance (GHSs) prend naissance en 1976 lorsque Cyril Y. Bowers, Frank A. Momany et leurs collaborateurs initiaient la recherche d'analogues opiacés ayant la propriété de moduler la sécrétion des neurohormones hypothalamiques hypophysiotropes (Bowers et al. 1977). À cet effet, ils observaient qu'un dérivé synthétique de la Met-enképhaline, dont la structure est détaillée à la Figure 1 (p. 4), le D-Trp²-Met-enképhaline, stimule faiblement la sécrétion de l'hormone de croissance (GH) *in vitro* sur des cultures primaires de cellules hypophysaires, alors qu'il est dépourvu d'activité opiacée (Bowers et al. 1980; Bowers et al. 1981). Entre 1978 et 1984, Momany se base sur des calculs théoriques de la conformation des dérivés afin de prédire, par modélisation structurale, de nouvelles séquences potentiellement actives. Émerge alors l'hexapeptide *GH Releasing Peptide-6*, GHRP-6 pourvu de propriétés sécrétagogues de GH *in vitro* et *in vivo* (Bowers et al. 1984; Momany et al. 1984). Le GHRP-6 a servi de prototype pour la synthèse de nombreux autres analogues d'une longueur variant entre 3 et 7 résidus actifs *in vitro*. Parmi ceux-ci, notons deux heptapeptides, le GHRP-1 et le GHRP-2 (Figure 1, p. 4), dotés d'un potentiel de sécrétion de GH de 2 à 3 fois supérieur à celui du GHRP-6 par administration i.v. chez le rat (Bowers 1993). La valeur du EC50 des peptides

cités est indiquée dans la Figure 1 (p.4) où les modifications structurales ayant servi à améliorer leur efficacité sont surlignées en bleu.

Simultanément à l'émergence des GHRP-1 et -2, l'équipe de Deghenghi développa l'hexapeptide EP 23905, aussi appelé hexaréline (Deghenghi 1997). L'hexaréline consiste en une substitution sur le GHRP-6 du D-Trp² par le 2-méthyl-D-Trp (D2MeTrp), de nature plus hydrophobe. L'hexaréline présente une stabilité accrue due à l'existence d'un tour-β dans sa structure secondaire, qui provoque le repliement de son extrémité carbonyle vers l'intérieur et la rend presque cyclique. Cette conformation empêche partiellement l'exposition des liens peptidiques aux peptidases, conduisant à une molécule plus stable sur le plan métabolique. De plus, la présence d'acides aminés de conformation D renforce la résistance de la molécule aux protéases. Depuis, diverses classes d'analogues présentant une amélioration grandissante de leur biodisponibilité orale ont été développées (les spiroindanylpipéridines, les benzolactames, les spiroindanes et les quinazolinones). Parmi ceux-ci, notons la spiroindane non-peptidique MK-0677, très active par voie orale, qui a atteint les études cliniques de phase II pour son effet sécrétagogue de GH (Patchett et al. 1995; Smith et al. 1997).

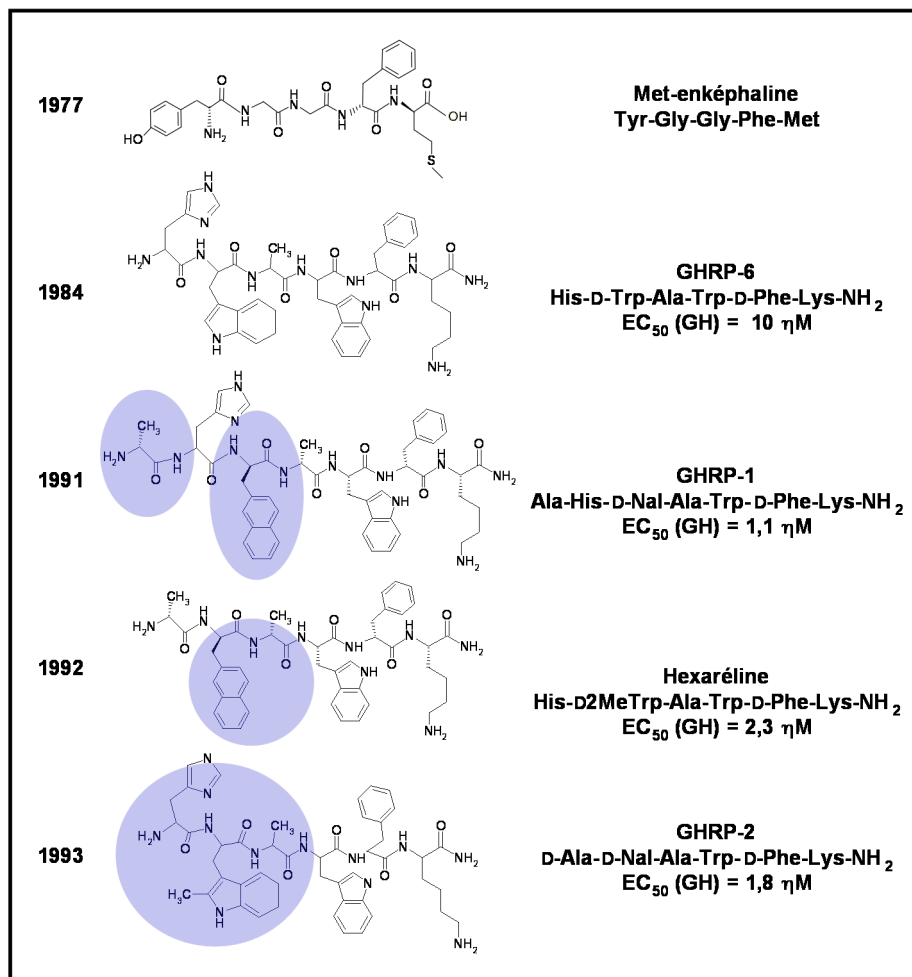


Figure 1 : Les sécrétines peptidiques

1.2 Le récepteur des GHSs est un récepteur distinct

Pendant de nombreuses années on a cru que la sécrétion pulsatile de GH par les cellules somatotropes de l'antéhypophyse était régulée par deux peptides hypothalamiques antagonistes : la somatolibérine (GHRH) stimulatrice (Guillemin et al. 1982) et la somatostatine inhibitrice (Brazeau et al. 1973). L'identification du mécanisme d'action

cellulaire des GHSs s'avère alors essentielle afin d'associer ou de discriminer l'effet des GHSs de celui des deux neurohormones (Smith et al. 1997). Un ensemble de données laissent alors présager l'existence d'une troisième voie neuro-endocrine du contrôle de la sécrétion de GH pour laquelle un récepteur distinct serait responsable de l'action des GHSs :

- Le GHRP-6 agit directement sur les cellules somatotropes pour produire la sécrétion de GH et potentialise l'effet du GHRH (Blake and Smith 1991).
- Le GHRH augmente les niveaux d'AMP cyclique (AMPC) des cellules somatotropes. Le GHRP-6 seul n'a aucun effet sur l'AMPC, mais amplifie l'effet du GHRH sur la production d'AMPC lorsque les deux peptides sont coadministrés (Cheng et al. 1989).
- Le GHRP-6 active les canaux calciques de type L et dépolarise la membrane plasmique des cellules somatotropes via l'inhibition des canaux potassiques (Mau et al. 1995), entraînant l'activation de la protéine kinase C (PKC) (Cheng et al. 1991), tandis que la protéine kinase A (PKA) est essentielle à la transduction du signal du GHRH (Sartin et al. 1996).

1.3 Identification et caractérisation des récepteurs GHSs

En 1996, le groupe de Smith isola le récepteur des GHSs (GHS-R) d'origine hypophysaire par une stratégie de clonage d'expression basée sur l'observation que l'activation du GHS-R entraîne une augmentation des concentrations de calcium intracellulaire (Howard et al. 1996). En résumé, la stratégie consistait tout d'abord en l'injection de groupes d'ARNm

poly(A)⁺ d'hypophyse de porc additionnés d'ARNm de sous-unités Gα₁₁ et d'ARN codant pour l'aequorine, une sonde bioluminescente sensible au calcium, dans des ovocytes de *Xenopus*. Ensuite, ils détectèrent la bioluminescence de l'aequorine en présence de MK-0677 et réduisèrent successivement la complexité de chacun des groupes d'ARN positifs pour en arriver à identifier l'ADNc d'un récepteur orphelin. La détermination de la séquence nucléotidique de l'ARNm du récepteur a permis d'affirmer que le GHS-R possède 7 passages transmembranaires et qu'il est couplé aux protéines G (Howard et al. 1996). À l'époque, le récepteur de la neurotensine était celui présentant la plus grande similarité (36 % d'homologie de séquence). D'autres membres de la famille ont ensuite été identifiés : le GPR38 (52 % d'homologie de séquence), reconnu subséquentement comme le récepteur de la motiline (Feighner et al. 1999), le GPR39 (29 % d'homologie de séquence) et les récepteurs 1 et 2 de la neuromédine U (33 % d'homologie de séquence) (McKee et al. 1997). L'alignement dendrogramme du GHS-R1a avec d'autres GPCRs est présenté à la Figure 2 (ci-dessous). De plus, le GHS-R présente une homologie de séquence protéique de 58% avec le récepteur cloné des poissons *Sphéroïde nephelus*. Le GHRP-6 ainsi que le MK-0677 activent le récepteur de *S. nephelus*, montrant que la structure fonctionnelle du GHS-R est conservée depuis au moins 400 millions d'années (Palyha et al. 2000).

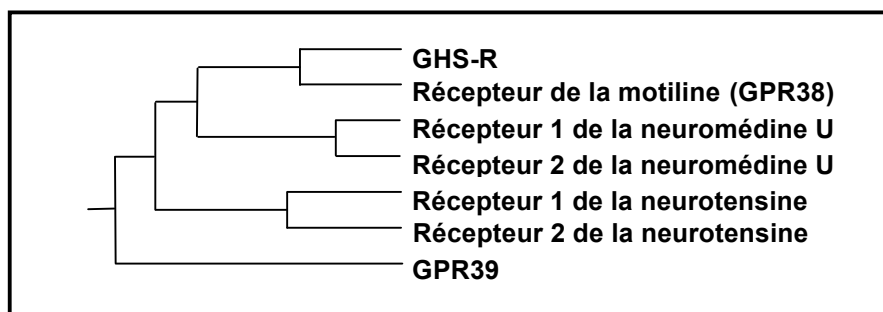


Figure 2 :
Alignement dendrogramme du récepteur de la ghréline avec d'autres GPCRs

Il existe deux isoformes du GHS-R, le GHS-R1a et le GHS-R1b, qui résultent de l'épissage alternatif du pré-ARNm d'un seul gène issu du chromosome 3q26.2. L'ARNm *Ghs-r1a* encode une protéine de 366 acides aminés (aa) de 41 kDa représentant la version fonctionnelle du récepteur, illustré à la Figure 3 (p.8). L'ARNm *Ghs-r1b* ne subissant pas l'épissage contient une séquence de 74 bases du deuxième intron situé entre les régions codant pour les domaines transmembranaires (TM) V et VI du GHS-R1a suivie d'un codon stop (Figure 3, p.8). Le type 1b encoderait donc une protéine de 289 aa équivalente aux passages transmembranaires I à V du GHS-R1a. Le GHS-R1b n'est pas activé par les GHSs et son rôle fonctionnel est non défini bien que son expression soit ubiquitaire. Les seules données disponibles montrent que le GHS-R1b est surexprimé dans les tumeurs bénignes et malignes adrénocorticales. De même, dans les carcinomes humains adrénocorticaux l'expression de l'ARNm *Ghs-r1b* est augmentée en réponse à la ghréline, exerçant un effet anti-prolifératif (Barzon et al. 2005).

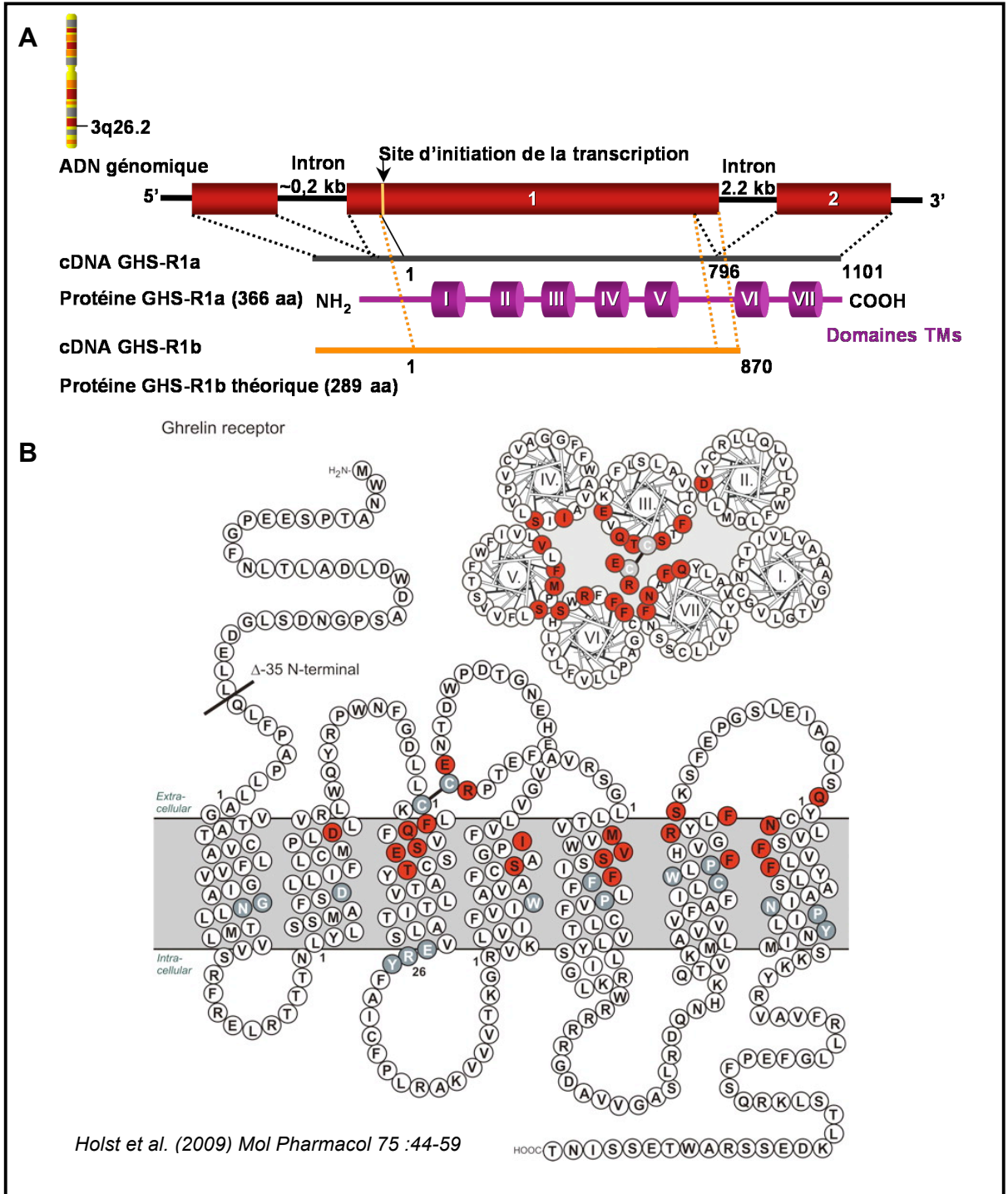


Figure 3 : (A) Structure du gène *Ghs-r1a* (B) Représentation serpentine et hélicale du GHS-R1a

1.3.1 Distribution du GHS-R1a

La présence de l'ARNm du GHS-R1a ou de sa protéine est détectée dans de nombreuses régions du système nerveux central (SNC), mais également dans plusieurs tissus périphériques. En plus de son expression dans les régions du cerveau régulant la sécrétion de GH (hypothalamus et hypophyse), l'ARNm du *Ghs-r1a* est exprimé dans les noyaux hypothalamiques (arqué, dorso- et ventro-médial, paraventriculaire), une cible majeure de la régulation de la prise de nourriture et de la balance énergétique. On retrouve également le récepteur dans l'aire tegmentale ventrale, le bulbe rachidien, le cortex cérébral, l'hippocampe (régions CA2 et CA3), les noyaux du raphé et la substance noire, qui sont des régions cervicales impliquées dans l'apprentissage, la cognition, l'humeur et la mémoire.

La présence du GHS-R au niveau du cerveau est probablement responsable de l'activité centrale des GHSs et la compréhension exacte du rôle du récepteur dans le système nerveux central est un point critique afin d'évaluer l'implication physiologique complète du GHS-R dans le vieillissement.

En périphérie, le GHS-R1a a été localisé sur de nombreuses glandes endocrines : les gonades, le pancréas, les surrénales et la thyroïde, ainsi que sur plusieurs organes : l'estomac, les intestins, le myocarde, la rate et les reins (Gnanapavan et al. 2002; Papotti et al. 2000; Yokote et al. 1998). La liaison de la ghréline est aussi détectée dans le système vasculaire incluant l'aorte, les artères coronaires, les artères pulmonaires, les artères arquées et les veines saphènes. Par ailleurs, la liaison de la ghréline est 4 fois supérieure

dans les artères coronaires provenant de sujets atteints d'athérosclérose (Katugampola et al. 2001).

Tableau I : Distribution du GHS-R1a

Système nerveux central	Périphérique
Détection de l'ARNm	
Aire tegmentale ventrale (Guan et al. 1997)	Aorte (Nagaya et al. 2001)
Bulbe rachidien (Hou et al. 2006)	Cellules musculaires lisses vasculaires (Kleinz et al. 2006)
Cortex cérébral (Hou et al. 2006)	Estomac (Shuto et al. 2001)
Hippocampe (Guan et al. 1997)	Glande thyroïde (Gnanapavan et al. 2002)
Hypothalamus (Cowley et al. 2003; Howard et al. 1996):	Glandes surrénales (Gnanapavan et al. 2002)
Noyau arqué (neurones du NPY et AgRP)	Hypophyse (Guan et al. 1997)
Noyau dorso- et ventro-médial	Intestin et système nerveux entérique (Dass et al. 2003; Wu et al. 2004)
Noyau paraventriculaire	Lymphocytes, neutrophiles (Hattori et al. 2001)
Éminence médiane	Monocytes/Macrophages (Demers et al. 2004)
Substance noire (Guan et al. 1997)	Myocarde (Kleinz et al. 2006; Nagaya et al. 2001)
Noyaux du raphé (dorsal et médian) (Guan et al. 1997)	Ovaires (Gaytan et al. 2003)
	Pancréas (Guan et al. 1997; Volante et al. 2002)
	Rate (Gnanapavan et al. 2002)
	Reins (Mori et al. 2000)
	Testicules (Tena-Sempere et al. 2002)
	Tissu adipeux (Choi et al. 2003)
	Tumeurs pulmonaires (Ghe et al. 2002)
	Utérus (Tawadros et al. 2007)
Détection de sites de liaison pour la ghréline	
Cervelet (Katugampola et al. 2001)	Artères (Katugampola et al. 2001): Pulmonaires Arquées (rein)
	<u>Muscle squelettique</u> (Pierno et al. 2003)
	<u>Tumeurs de la prostate</u> (Cassoni et al. 2004)
	<u>Veines saphènes</u> (Katugampola et al. 2001)
<u>Site détecté mais absence du GHS-R1a</u>	

Finalement, on détecte l'ARNm *Ghs-r1a* sur les cellules circulantes : lymphocytes, neutrophiles et monocytes, et aussi sur le tissu adipeux et l'utérus. Le Tableau I (p.10) indique de façon exhaustive la distribution du GHS-R1a dans l'organisme ou encore l'identification des tissus qui présente un site de liaison pour la ghréline sans toutefois qu'il n'y ai eu détection du GHS-R1a.

1.3.2 Voies de signalisation impliquées dans l'activation du GHS-R1a

L'activation du GHS-R1a initie la transmission de nombreux signaux intracellulaires. La voie d'activation dite classique met en jeu l'hétérotrimère $G\alpha_{11}/\beta\gamma$ alors que les autres voies font intervenir principalement les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPKs), la kinase-3 phosphoinositides (PI3-K)/Akt, l'oxyde nitrique synthase (NOS) ou encore la PKA selon le contexte cellulaire. Les mécanismes de signalisation enclenchés par la ghréline ainsi que les effets biologiques résultants sont résumés dans le Tableau II (p.11-12). Certains de ces mécanismes seront décrits plus en détail dans la section 1.4 (p.19), qui suivra la présente section.

Tableau II : Voies de signalisation modulées par la ghréline

<i>Effet</i>	<i>Récepteur</i>	<i>Voie de signalisation</i>	<i>Type cellulaire</i>
Prolifération cellulaire	GHS-R1a	$G\alpha_i/PI3-K/PKC/MAPK$	Cellules préadipocytaires (Kim et al. 2004)
		PI3-K/Akt	Cellules d'adénocarcinomes pancréatiques (Duxbury et al. 2003)
		-	Cellules cancéreuses de la prostate (Jeffery et al. 2002)
		ERK1/2, PI3-K/Akt	Cellules endothéliales aortiques (Rossi et al. 2008)
		IRS-1/PI3-K/GRB2/MAPK	Cellules d'hépatomes (Murata et al. 2002)
		-	Kératinocytes (Groschl et al. 2005)

<i>Effet</i>	<i>Récepteur</i>	<i>Voie de signalisation</i>	<i>Type cellulaire</i>
Prolifération cellulaire (suite)	GHS-R1a (suite)	PKC/ERK1/2, RTK	Cellules somatotropes de l'hypophyse (Nanzer et al. 2004)
		TK/MAPK	Cellules de la surrénale (Andreis et al. 2003; Mazzocchi et al. 2004)
		GMPc/NO	Ostéoblastes (Maccarinelli et al. 2005; Sang Wan et al. 2005; Wang et al. 2009)
	GHS-R1a-indépendant	NOS/NO, Prostaglandines-COX (par le nerf vague)	Cellules épithéliales gastrointestinales (Brzozowski et al. 2004; Brzozowski et al. 2006)
		ERK1/2	Cellules cancéreuses de la prostate (Yeh et al. 2005)
Anti-prolifération	GHS-R1a	-	Cellules erythroleucémiques (De Vriese et al. 2005)
		ERK1/2, PI3-K	Ostéoblastes (Delhanty et al. 2006)
	GHS-R1a-indépendant	AMPc/PKA	Cellules musculaires lisses aortiques (Rossi et al. 2009)
		-	Cellules musculaires lisses vasculaires (Zhang et al. 2008)
		-	Cellules cancéreuses du sein (Cassoni et al. 2001)
Anti-apoptotique	n.d.	-	Cellules cancéreuses de la prostate (Cassoni et al. 2004)
		ASK1/HSP70	Cellules glomérulées de la glande surrénale (Yang et al. 2007a)
	GHS-R1a-indépendant	ERK1/2, PI3-K/Akt	Cardiomyocytes (Baldanzi et al. 2002)
		-	Cellules endothéliales (Baldanzi et al. 2002)
		G α_s /adenylate cyclase/AMPc/PKA	Cellules β du pancréas (Granata et al. 2007)
Régulation de la gluconéogenèse	GHS-R1a	ERK1/2, PI3-K/Akt	Cellules musculaires lisses vasculaires (Zhang et al. 2008)
		-	Cellules préadipocytaires (Kim et al. 2004)
	GHS-R1a-indépendant	-	Cellules d'hépatomes (Murata et al. 2002)
Différentiation	GHS-R1a	-	Hépatocytes (Gauna et al. 2005)
Régulation de la prise de nourriture	GHS-R1a	-	Ostéoblastes (Maccarinelli et al. 2005)
Angiogénique	GHS-R1a	LKB1/AMPK NOS/NO	Cellules hypothalamiques (Andersson et al. 2004)
Anti-angiogénique	GHS-R1a	ERK2	Cellules endothéliales microvasculaires (Li et al. 2007)
Anti-inflammatoire	GHS-R1a	-	Cellules endothéliales (Conconi et al. 2004)
	GHS-R1a	Inhibe NF- κ B	Cellules endothéliales (Li et al. 2004)
		-	Lymphocytes T/monocytes (Dixit et al. 2004)

1.3.2.1 La voie classique

Le GHS-R1a appartient à la famille A des GPCRs. Il est couplé à une sous-unité $G_{\alpha 11}$. L'activation de $G_{\alpha 11}$ active la phospholipase C_{β} (PLC β) qui produit les seconds messagers inositol (1,4,5) trisphosphate (IP $_3$) et diacylglycérol (DAG). L'augmentation d'IP $_3$ provoque une libération de calcium (Ca^{2+}) dans le cytosol à partir des réserves du réticulum endoplasmique (Chen et al. 1996). L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire active la translocation de la protéine kinase C (PKC) du cytosol à la membrane plasmique où elle est activée par la liaison du Ca^{2+} et la phosphorylation par le DAG. L'activation de la PKC est associée à une activation des canaux calciques voltage dépendant de type L de la membrane plasmique, ce qui permet l'entrée du Ca^{2+} présent dans les fluides extracellulaires. L'activation du GHS-R1a inhibe également les canaux potassiques et en conséquence empêche la repolarisation des cellules somatotropes avec amplification de l'entrée de Ca^{2+} par les canaux voltage dépendant de types L et T. L'élévation persistante de la concentration du calcium intracellulaire stimule la sécrétion de GH (Herrington and Hille 1994). Cette voie fut la première décrite au niveau de l'hypophyse (Figure 4, p.14). Depuis de nombreuses autres voies de signalisation ont été décrites par l'activation du GHS-R1a et elles semblent être en partie spécifique au type cellulaire impliqué.

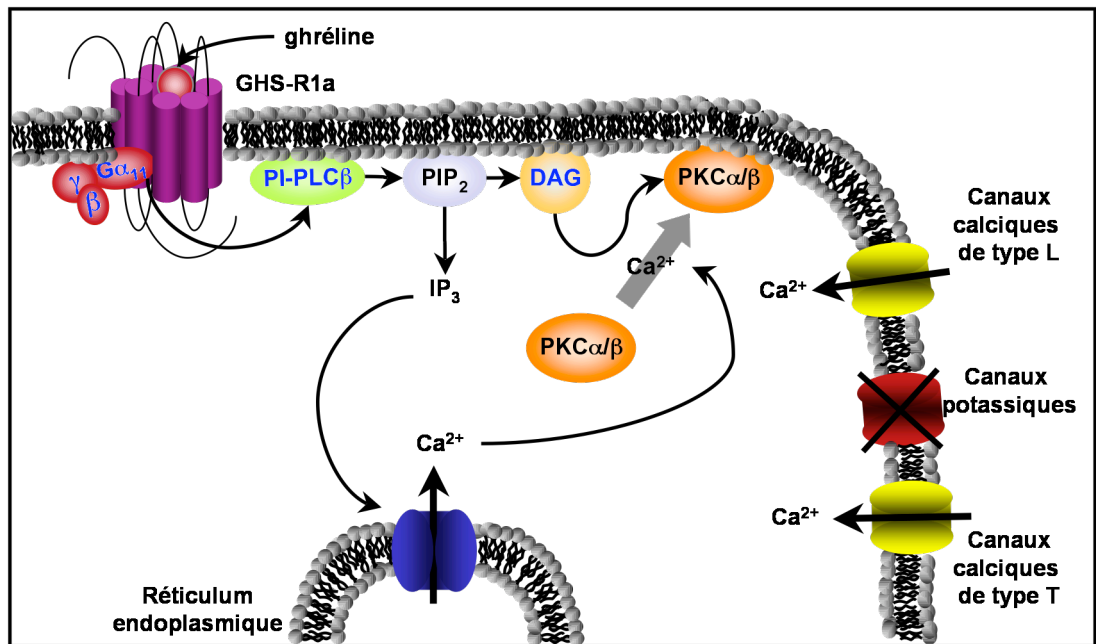


Figure 4 : Signalisation classique du récepteur de la ghréline

1.3.3 Le GHS-R1a est constitutivement actif

La plupart des GPCRs signalent même en absence de ligand (Costa and Cotecchia 2005). Ce phénomène reflète un mécanisme d'action moléculaire par lequel un récepteur est en état d'équilibre entre sa conformation active et inactive et il peut ainsi facilement atteindre un état activé même en absence de ligand (Schwartz et al. 2006). Pour la plupart des GPCRs, l'activité constitutive représente une faible fraction de la capacité maximale de signalisation. Par contre, la mesure du métabolisme des IP₃ montre que le GHS-R1a présente déjà 50% de son activité maximale en l'absence d'agoniste (Holst et al. 2003). Tel qu'illustré à la Figure 5 (p.15), un rassemblement de résidus aromatiques situé sur la face interne des passages transmembranaires VI (Phe 16) et VII (Phe 6 et 9) serait

structurellement important à cette activité constitutive (Holst et al. 2004). Il est intéressant à noter que l'activité constitutive du GHS-R1a n'est pas observée pour la signalisation vers les MAPKs. Ceci signifie que plusieurs conformations actives pourraient exister pour le récepteur et que l'activité constitutive du récepteur ne refléterait pas nécessairement toutes les voies de signalisation activables par la ghréline (Chu et al. 2007).

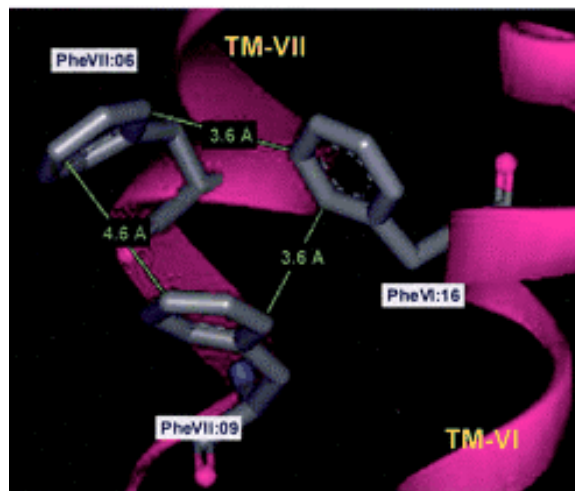


Figure 5 : Résidus impliqués dans l'activation du GHS-R1a

Holst et al. (2004) J Biol Chem 279(51);53806-17

L'implication physiologique de l'activité constitutive du GHS-R1a est encore mal comprise. Une hypothèse est que l'expression du GHS-R1a sur les neurones hypothalamiques des neuropeptides Y/AgRP contribuerait à une stimulation tonique de l'appétit en absence de ghréline (Holst and Schwartz 2004). Par ailleurs, la mutation A204E sur le GHS-R1a affecte l'activité constitutive du récepteur sans modifier la réponse à la ghréline. Cette mutation est associée à la petite taille familiale (Pantel et al. 2006).

L'activité constitutive importante de GHS-R1a soulève plusieurs questions concernant le rôle physiologique potentiel d'agoniste inverse endogène encore non identifié. Dans cette perspective, l'agoniste inverse synthétique, [D -Arg¹, D -Phe⁵, D -Trp^{7, 9}, Leu¹¹] substance P

(SP-A) stabilise la conformation inactive du GHS-R1a, avec inhibition de l'appétit et de la signalisation constitutive du GHS-R1a (Holst et al. 2006). De ce fait, le SP-A est présenté comme un agent anti-obésité potentiel.

1.3.4 L'endocytose du GHS-R1a

La liaison de la ghréline au GHS-R1a déclenche rapidement l'internalisation du complexe récepteur-ligand dans les puits recouverts de clathrines. La dissociation du complexe ghréline-GHS-R1a se produit dans les endosomes précoces et la ghréline est alors dégradée dans l'endosome (Pantel et al. 2006). De son côté, le récepteur est recyclé à la membrane plasmique par un processus extrêmement lent en comparaison avec les autres GPCRs (3-6 h) dû à la formation d'un complexe stable entre les β -arrestines et le GHS-R1a lors de l'endocytose (Camina et al. 2004; Luttrell and Lefkowitz 2002; Oakley et al. 1999). La lenteur du recyclage coïncide avec l'incapacité de la ghréline à restimuler la sécrétion de l'hormone de croissance lors d'une deuxième injection administrée dans un intervalle de temps inférieur à 60 min (Tolle et al. 2001). La séquestration du GHS-R1a par les β -arrestines semble agir comme voie alternative spécifique de l'activation tardive des MAPKs au détriment de la voie $G\alpha_{11}$ -PLC-PKC (Camina et al. 2007).

Le GHS-R1a subit également une internalisation basale, qui reflète son activité intrinsèque élevée, par un mécanisme différent de celui résultant de l'activation du récepteur par un agoniste puisque l'endocytose se produit en absence de phosphorylation du récepteur et indépendamment des β -arrestines (Holliday et al. 2007). Il apparaît donc que les mécanismes de signalisation induits suite à l'activation et l'internalisation du GHS-R1a par

un ligand sont différents de ceux qui sont issus de l'activité basale du récepteur et ils se concluraient par des activités physiologiques spécifiques.

1.3.5 Homo- et hétéro-oligomérisation du GHS-R1a

La formation d'homo- et d'hétéro-oligomères entre le récepteur GHS-R1a et les récepteurs de la dopamine et des prostanoïdes a été proposée (Chow et al. 2008; Jiang et al. 2006; Jiang et al. 2008). Cependant, l'importance physiologique de ces complexes est encore à déterminer puisque toutes les expérimentations jusqu'ici proposées ont été effectuées dans des modèles de surexpression des récepteurs.

1.3.5.1 Homo-oligomérisation GHS-R1a/GHS-R1b

Il y a formation d'homo-oligomères de GHS-R1a et aussi d'hétéro-oligomères de GHS-R1a/GHS-R1b. Toutefois, la ghréline active seulement le complexe homo-oligomérique de récepteurs. La présence d'un excès de GHS-R1b diminue l'expression du GHS-R1a à la surface cellulaire, et conséquemment, diminue son activité constitutive $G\alpha_{11}$ -PI-PLC. Par contre, l'activation du récepteur par la ghréline est préservée ainsi que sa signalisation vers la voie des MAPKs (Leung et al. 2007). Le GHS-R1b pourrait ainsi agir comme dominant négatif du GHS-R1a en atténuant préférentiellement son activité constitutive.

1.3.5.2 Hétéro-oligomérisation avec le récepteur de la dopamine

Jiang et *coll.* ont identifié la formation d'hétérodimères entre le GHS-R1a et un récepteur de la dopamine. L'activation du GHS-R1a par la ghréline amplifie l'accumulation d'AMPC induite par la stimulation du récepteur de la dopamine DR1 par son agoniste. Cette

amplification est consécutive d'un changement de conformation du GHS-R1a, induit par la formation de l'hétérodimère GHS-R1a/DR1, qui modifie le couplage des protéines G de la sous-unité $G\alpha_{q/11}$ vers $G\alpha_{i/o}$ et incite la dissociation des sous-unités $\beta\gamma$ et leur association à l'adénylate cyclase, tel qu'illustré à la Figure 6 (ci-dessous). La ghréline pourrait ainsi potentialiser l'effet de la dopamine sur les neurones qui expriment les récepteurs DR1 et GHS-R1a (Jiang et al. 2006; Jiang et al. 2008).

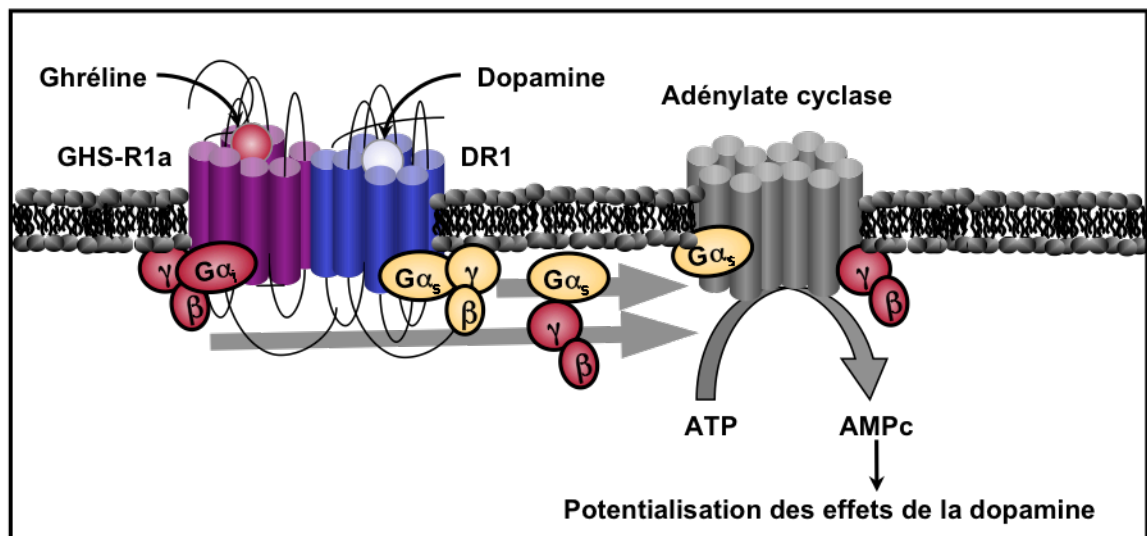


Figure 6 : L'hétérodimérisation GHS-R1a/DR1

1.3.5.3 Hétéro-oligomérisation avec le récepteur des prostanoides

Les effets vasodilatateurs et anti-inflammatoires de la ghréline ont suggéré une possible oligomérisation avec les récepteurs des prostanoides qui sont impliqués dans la régulation de l'inflammation et de l'activité vasculaire. Par des études de transfert d'énergie en bioluminescence (BRET) et coimmunoprecipitation, des hétéro-oligomères avec le GHS-R1a ont été observés en présence du récepteur des prostaglandines E2, du récepteur des

prostacyclines et du récepteur de la thromboxane A2. La cotransfection des hétéro-oligomères provoque l'internalisation du GHS-R1a et diminue ainsi son activité constitutive (Chow et al. 2008). L'expression des récepteurs des prostanoïdes en conditions inflammatoires pourrait donc influencer les réponses cellulaires produites par l'activité constitutive du récepteur GHS-R1a.

1.4 Identification du ligand naturel du GHS-R1a : la ghréline

En décembre 1999, la purification et l'identification d'un ligand endogène du GHS-R1a furent rapportées pour la première fois par l'équipe de Kenji Kangawa (Kojima et al. 1999). Le ligand, isolé d'extraits d'estomac, a été nommé ghréline d'après la racine proto-indo-européenne « *ghre* » signifiant croissance en référence à son action de stimulation de la sécrétion de GH. L'addition du suffixe « *lin* » permet d'apporter une référence pour *release* « *GHrelin* » de l'anglais signifiant libération (Kojima 2008).

Les deux-tiers de la ghréline circulante sont produits par les cellules X/A-like de la muqueuse oxyntique de l'estomac et la majorité du tiers restant provient de la même souche de cellules, mais au niveau du petit intestin. Toutefois, une petite quantité de ghréline est produite par d'autres organes comme le pancréas, les reins, le placenta, les tissus lymphatiques, les gonades, la thyroïde, les surrénales, le coeur, les poumons, les yeux, l'hypophyse et l'hypothalamus, ainsi que par plusieurs tissus néoplasiques et des cellules cancéreuses (Date et al. 2000; Date et al. 2002; Gnanapavan et al. 2002; Gualillo et al. 2001; Hattori et al. 2001; Hosoda et al. 2000; Kojima et al. 1999; Mori et al. 2000;

Muccioli et al. 2002; Tanaka et al. 2001; Tena-Sempere et al. 2002; Volante et al. 2002). La ghréline produite par ces tissus pourrait exercer un effet autocrine-paracrine.

Le gène de la ghréline humaine (*Ghrl*) est localisé sur le chromosome 3p25-26. Il est composé de 4 exons et 3 introns (Wajnrajch 2000) qui encodent pour un précurseur de 117 aa, la prépro-ghréline (Kojima et al. 1999). La préproghréline est subséquentement clivée en un peptide de 28 aa, la ghréline, illustrée en rose à la Figure 7 (p.21). La ghréline est le premier peptide naturel sur lequel on a rapporté une modification post-transcriptionnelle d'acylation particulière, soit l'ajout d'un groupement η -octanoyl sur sa sérine en position 3 (Kojima et al. 1999). Cette modification est essentielle pour l'activité biologique de la ghréline sur le GHS-R1a. Cependant, la forme déacylée (déacyl-ghréline), qui ne peut se lier au GHS-R1a, induit des effets physiologiques via un autre récepteur encore inconnu à ce jour (Chung et al. 2008; Gauna et al. 2005; Granata et al. 2007). L'acide octanoïque est ajouté dans le réticulum endoplasmique par l'*O*-acétyltransférase de la ghréline (GOAT), qui est le seul membre de la famille des MBOATs (*O*-acétyltransférases liées à la membrane) à ajouter de courtes chaînes de 8 carbones (Yang et al. 2008). Il semble également que les trois premiers acides aminés de la ghréline constituent le noyau actif de la molécule (Silva Elipe et al. 2001). Par ailleurs, cette séquence est universellement conservée à travers les espèces (Palyha et al. 2000).

Il existe un variant de la ghréline, présent en quantité moindre, mais pareillement actif : la des-Gln ghréline, qui est produite par un épissage alternatif lors duquel le résidu 14 Gln est absent (marqué d'un astérisque dans le Figure 7, p.21). Le gène de la ghréline produit

également l'hormone obestatine (en rouge), qui semble pourvu des effets inverses de ceux de la ghréline sur l'homéostasie énergétique, la fonction gastrointestinale, l'anxiété et la faim. Le récepteur physiologique de l'obestatine n'a pas encore été identifié (Tang et al. 2008).

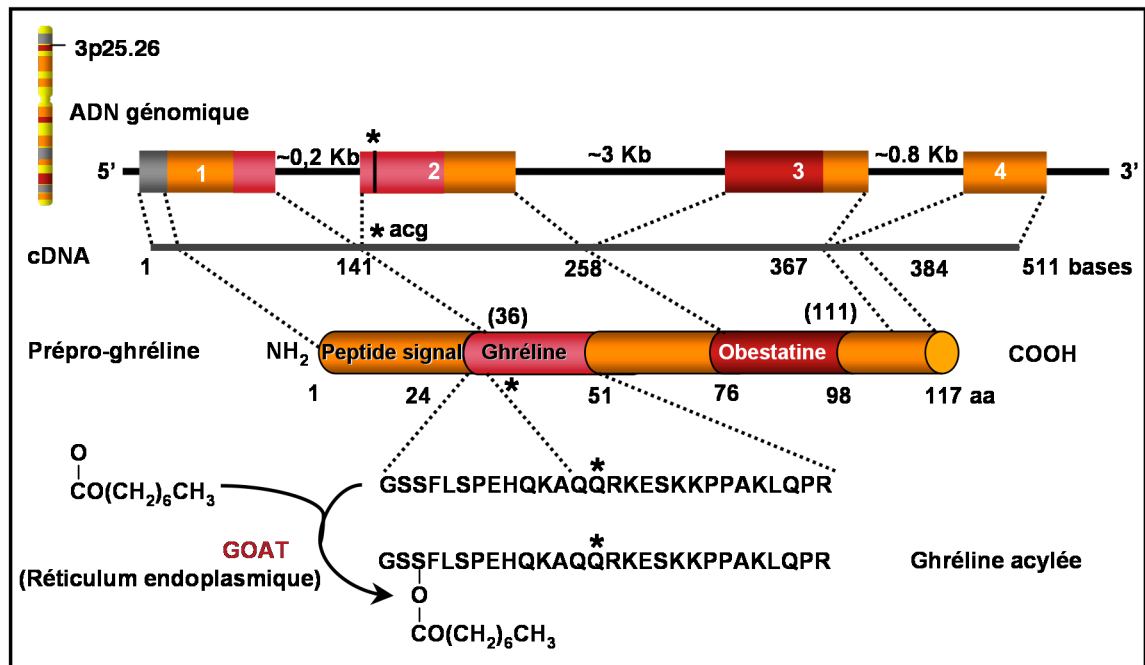


Figure 7 : Le gène de la prépro-ghréline

1.5 Activités biologiques de la ghréline

Depuis la découverte de l'effet sécrétagogue de GH de la ghréline via sa liaison au GHS-R1a exprimé par l'hypophyse, de nombreux effets périphériques comme la régulation du métabolisme énergétique, des effets immunomodulateurs, des effets sur la prolifération et sur le système cardiovasculaire ont été décrits. Le Tableau III (p.22-23) résume les différents effets biologiques de la ghréline qui seront détaillés dans la prochaine section.

Tableau III : Effets physiologiques de la ghréline

<i>Système ciblé</i>	<i>Effets</i>	(↑) stimule (↓) inhibe
Endocriniens	<ul style="list-style-type: none"> ↑ sécrétion de l'hormone de croissance (Broglia et al. 2003; Popovic et al. 2003) ↑ sécrétion de l'adrénocorticotropine (ACTH) et du cortisol (Korbonits et al. 2004) ↑ sécrétion de prolactine (Tena-Sempere 2005) ↓ sécrétion de testostérone et de l'hormone lutéinisante (Tena-Sempere 2005) ↑ sécrétion de vassopressine (Coiro et al. 2005) ↑ sécrétion d'aldostérone (Arvat et al. 2001) ↓ la spermatogenèse (Barreiro et al. 2004) 	
Métaboliques	<ul style="list-style-type: none"> ↑ appétit (Kola et al. 2008; Tschop et al. 2000) régule le métabolisme des substrats (Tschop et al. 2000) 	
du glucose	<ul style="list-style-type: none"> ↑ production de glucose des hépatocytes (Gauna et al. 2005) ↓ sécrétion et l'action de l'insuline (Dezaki et al. 2007) 	
des lipides	<ul style="list-style-type: none"> ↑ action de l'insuline en périphérie et ↓ son action dans le foie (Pusztai et al. 2008) ↑ prolifération des adipocytes (Thompson et al. 2004) ↑ lipogenèse, ↓ lipolyse (Muccioli et al. 2004) régule le contenu lipidique des tissus ↑ foie et ↓ muscle (Barazzoni et al. 2005) 	
Cardiovasculaires	<ul style="list-style-type: none"> ↑ débit systolique et l'index cardiaque (Nagaya et al. 2001) ↑ vasodilatation systémique (Okumura et al. 2002) ↓ la résistance périphérique (Nagaya and Kangawa 2003) ↓ pression artérielle (Nagaya et al. 2001) ↓ apoptose des cardiomyocytes (Nanzer et al. 2004) ↑ pression de perfusion coronaire par vasoconstriction les artérioles coronaires (Cao et al. 2006) inverse l'hypertrophie du ventricule droit et le remodelage vasculaire lors d'hypertension pulmonaire (Henriques-Coelho et al. 2006) améliore la fonction endothéliale (Tesauro et al. 2005) 	
Système nerveux autonome	<ul style="list-style-type: none"> ↓ activité sympathique (Lin et al. 2004) ↓ thermogenèse (Yasuda et al. 2003) ↓ sécrétion de la sérotonine (Brunetti et al. 2002) 	
Immunologiques	<ul style="list-style-type: none"> ↓ expression de cytokines pro-inflammatoires : IL-1β, IL-6, et TNF-α (Dixit and Taub 2005) ↓ prolifération des cellules T activées anti-CD3 et des cytokines Th1 et Th2 (Gonzalez-Rey et al. 2006) ↑ division cellulaire des cellules lymphoïdes (Koo et al. 2001) ↓ l'effet pro-inflammatoire de la leptine sur les neutrophiles et les cellules T (Hattori 2009) ↓ inflammation lors de l'arthrite (Gao et al. 2009) ↑ perfusion tissulaire lors de septicémie (Wu et al. 2007) ↓ réponse inflammatoire lors de colite (Gonzalez-Rey et al. 2006) 	

<i>Système ciblé</i>	<i>Effets</i>	(↑) stimule (↓) inhibe
Musculosquelettiques	↓ activité métabolique des chondrocytes (Caminos et al. 2005) ↑ production et l'action des ostéoblastes (Malagon et al. 2003) affecte l'activité locomotrice (Tang-Christensen et al. 2004)	
Gastrointestinaux	↓ et ↑ la sécrétion exocrine de l'estomac (Yakabi et al. 2006) ↑ vidange gastrique et la motilité du tractus gastrointestinal (Tack et al. 2006) ↓ temps de transit du colon (Tebbe et al. 2005)	
Autres	↑ anxiété (Asakawa et al. 2001) ↑ le sommeil (Ghigo et al. 2001) ↑ l'apprentissage et la mémoire (Diano et al. 2006) effets sur la prolifération cellulaire	

1.5.1 Effets neuroendocrines de la ghréline

Le premier effet caractérisé de la ghréline est l'action sécrétagogue de GH et les GHSs furent par ailleurs développés pour ce but particulier. L'effet de la ghréline sur la sécrétion de GH est dose-dépendant, est inversement proportionnel à l'âge du sujet et est synergique avec l'action du GHRH (Broglia et al. 2003; Hataya et al. 2001; Takaya et al. 2000). L'action de la ghréline nécessite par ailleurs l'intégrité de la fonction du système GHRH intact puisqu'après immunoneutralisation du GHRH endogène, l'action de la ghréline est fortement inhibée (Tannenbaum et al. 2003). La ghréline stimule également faiblement la sécrétion de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), du cortisol et de la prolactine après injection i.v. chez l'homme (Arvat et al. 2001; Malagon et al. 2003).

1.5.1.1 Mécanisme impliqué dans l'activité neuroendocrinienne de la ghréline

La ghréline agit centralement en augmentant l'activité électrique et l'expression du gène *c-fos*, un marqueur de l'activité neuronale, dans une sous-population de cellules (majoritairement les neurones NPY) du noyau arqué (Hewson and Dickson 2000). L'action directe de la ghréline sur le GHS-R1a des cellules somatotropes hypophysaires produit la

dépolarisation des cellules via l'activation de la cascade de signalisation classique PLC/IP₃/PKC (Figure 4, p.14). Tel qu'illustré à la Figure 8 (p.24), la ghréline active aussi indirectement la signalisation de l'adénylate cyclase (AC)/AMPc/PKA qui provient du récepteur GHRH et augmente l'activation de CREB qui initie la transcription et la sécrétion de GH. Également, un nombre croissant d'évidences suggèrent que l'initiation de la synthèse du NO par la NOS et la production subséquente de GMPc par la guanylate cyclase jouerait un rôle dans la réponse somatotrope *in vitro* (Malagon et al. 2003; Rodriguez-Pacheco et al. 2008).

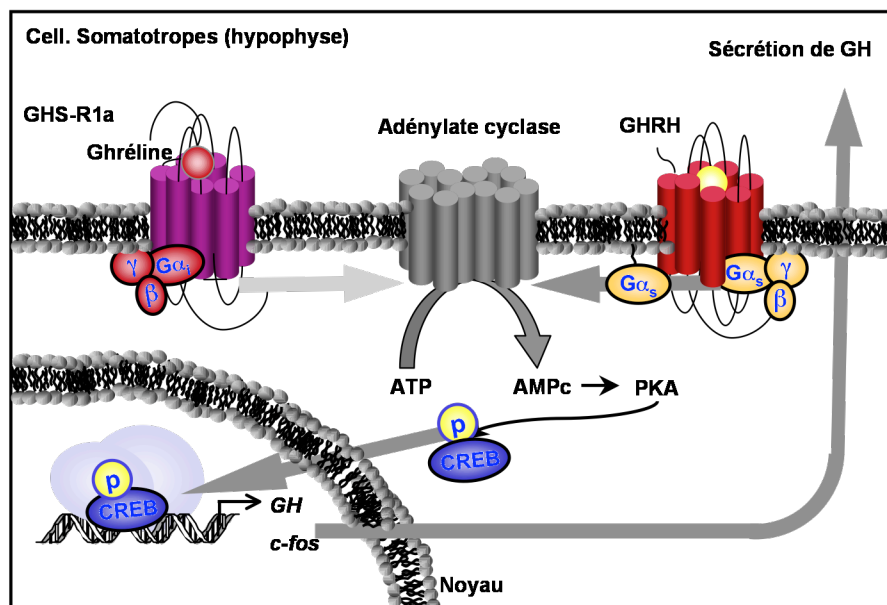


Figure 8 : Mécanisme d'action de la ghréline sur la sécrétion de l'hormone de croissance

1.5.2 Action orexigène et sur l'obésité

Tel que pouvait laisser présager la localisation du récepteur GHS-R1a au niveau des neurones NPY/AgRP du noyau arqué, l'administration périphérique de la ghréline stimule

l'appétit et augmente la prise alimentaire à court terme et par conséquent, le poids corporel (Tschop et al. 2000). Chez l'homme, les concentrations de ghréline circulante sont très élevées juste avant les repas, appuyant son rôle comme signal orexigène (Cummings et al. 2001). Des études électrophysiologiques montrent que la ghréline active directement les neurones NPY et orexin au niveau présynaptique, qui ensuite inactivent les neurones anorexigènes de la proopiomélanocortine (POMC) via une transmission GABAergique (Riediger et al. 2003; Traebert et al. 2002). De même, l'effet orexigène de la ghréline est aboli suite à l'injection intracérébroventriculaire d'anticorps contre le NPY et l'AgRP ou encore suite à la délétion des gènes *NPY* et *AgRP* (Chen et al. 2004; Nakazato et al. 2001; Shintani et al. 2001).

L'action de la ghréline sur les neurones NPY/AgRP implique la modulation de la respiration mitochondriale, un processus par lequel la mitochondrie oxyde les acides gras. La Figure 9 (p.26) illustre ce mécanisme, qui résulte de l'activation successive de la kinase activée par l'AMP (AMPK) et de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), entraînant une diminution de la concentration cytosolique de malonyl-CoA. Cette diminution lève l'inhibition sur la carnitine palmitoyltransférase-1 (CPT1), qui utilise les acides gras à longues chaînes et produit des radicaux libres (espèces réactives de l'oxygène, ROS) par le processus de β -oxydation. La protéine découplante mitochondriale 2 (UCP2) est alors activée afin d'éliminer les ROS, ce qui a pour effet de maintenir le potentiel d'action neuronal élevé (Andrews et al. 2008). Ceci suggère que l'AMPK est impliquée dans l'activation électrique des neurones NPY/AgRP par la ghréline et dans l'effet orexigène

suivant une balance énergétique négative. Le noyau arqué orchestre ainsi la réponse du cerveau aux changements dans la demande énergétique par l'intermédiaire de la ghréline (Abizaid and Horvath 2008).

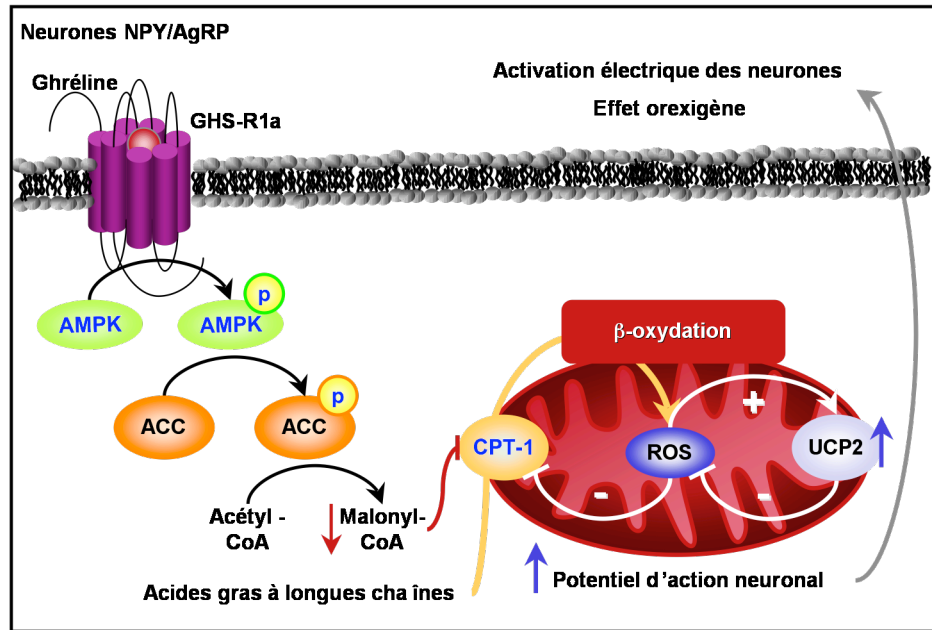


Figure 9 : Mécanismes d'action de l'effet orexigène de la ghréline

Des études cliniques ont utilisé la ghréline comme agent orexigène en conditions de manifestation d'anorexie ou de cachexie (ex. cancer et insuffisance cardiaque congestive) et ont montré une augmentation du gain énergétique variant de 31 à 100% (Nagaya et al. 2004; Neary et al. 2004; Wynne et al. 2005). Des antagonistes de la ghréline sont également en essais précliniques afin d'ouvrir la voie pour leur utilisation thérapeutique future contre l'obésité chez l'homme (Beck et al. 2004).

1.5.3 Action de la ghréline sur le métabolisme énergétique

En plus de son rôle d'initiateur de la prise de nourriture et de régulateur à court terme de la balance énergétique, la ghréline est impliquée dans la régulation de l'homéostasie énergétique à long terme par son action sur le métabolisme des lipides et du glucose.

1.5.3.1 Le métabolisme des lipides

Une concentration faible de ghréline circulante est associée à plusieurs composantes du syndrome métabolique comme l'obésité, la résistance à l'insuline, le diabète de type 2 et l'hypertension (Choi et al. 2004; Ingelsson et al. 2008; Katsuki et al. 2004; Langenberg et al. 2005; Lee et al. 2008; Poykko et al. 2003; Yano et al. 2009).

L'administration chronique de ghréline diminue la dépense énergétique et favorise l'utilisation accrue des carbohydrates au détriment des acides gras. Il en résulte une augmentation de l'adiposité chez les animaux traités avec la ghréline et ce malgré une ingestion calorique identique à celle des animaux contrôles (Tschop et al. 2000). Ceci suggère un effet spécifique indépendant de l'effet orexigène. Sur les adipocytes primaires en culture, la ghréline augmente l'expression de PPAR γ , principal régulateur de la différenciation adipocytaire. *In vivo*, la ghréline et également la déacyl-ghréline stimulent l'adipogenèse vraisemblablement par l'intermédiaire d'un récepteur distinct du GHS-R1a (Muccioli et al. 2004; Thompson et al. 2004). La ghréline, à l'inverse de son effet sur les neurones NPY/AgRP, inhibe l'activité de l'AMPK dans le tissu adipeux et également dans le foie. Dans le foie, cette inhibition de l'AMPK induit l'expression de gènes lipogéniques et augmente par conséquent le contenu en triglycérides.

À l'opposé, la ghréline réduit le contenu lipidique dans le muscle gastrocnémien. Le mécanisme impliqué est indépendant à l'AMPK et origine plutôt de l'augmentation d'expression de PPAR γ et de l'augmentation d'activité des enzymes mitochondriaux oxydatifs cyclooxygénase (COX) et UCP2. La ghréline favorise donc le dépôt des triglycérides dans le foie et le tissu adipeux au détriment du muscle squelettique. Il se pourrait toutefois que cet effet résulte de la diminution d'acides gras circulants suite à l'accumulation préférentielle d'acides gras dans le foie et le tissu adipeux (Barazzoni et al. 2005; Kola et al. 2005).

1.5.3.2 Le métabolisme du glucose

Il existe une corrélation inverse entre les niveaux de ghréline et d'insuline circulantes. L'administration aiguë de ghréline chez l'humain diminue la sécrétion d'insuline et induit une hyperglycémie (Broglia et al. 2001). D'une part, l'effet hypoinsulinémiant de la ghréline peut être indirect, par l'inhibition de la sécrétion de l'adiponectine, une hormone qui potentialise les effets de l'insuline (Ott et al. 2002). Pourtant, l'effet hyperglycémiant de la ghréline est indépendant de la sécrétion de GH puisqu'il est observé chez les souris *little* déficientes en GH. La ghréline pourrait également produire son effet hyperglycémiant en stimulant la sécrétion d'hormones ayant un effet contraire à celui de l'insuline comme le glucagon (Salehi et al. 2004), le cortisol et l'épinéphrine (Paola et al. 2005). Certains auteurs avancent qu'au contraire ce serait plutôt l'insuline qui régulerait de façon inhibitrice le niveau plasmatique de la ghréline (Pusztai et al. 2008). D'autre part, la ghréline a un effet hyperglycémiant direct puisqu'elle augmente la production de glucose hépatique (Gauna et

al. 2005; Murata et al. 2002). Elle inhibe la sécrétion d'insuline par le pancréas et elle empêche l'insuline de supprimer la production endogène de glucose (Broglia et al. 2001; Broglia et al. 2008; Poykko et al. 2003; Tassone et al. 2003).

1.5.3.3 Mécanisme d'action de la suppression de sécrétion d'insuline par la ghréline dans le pancréas

La ghréline et le GHS-R1a sont exprimés dans les cellules α , β et ϵ des ilots pancréatiques (Date et al. 2002; Dezaki et al. 2007; Heller et al. 2005; Volante et al. 2002; Wierup and Sundler 2005; Wierup et al. 2002). Des études de patch-clamp sur les cellules β montrent que la ghréline augmente l'amplitude des courants potassiques K_v sortants par un mécanisme sensible à la toxine pertussis (PTX). L'effet insulino-statique de la ghréline, illustré à la Figure 10 (p.30), implique l'activation de la sous-unité $G\alpha_i2$ et le mécanisme de transduction du signal est donc distinct de celui utilisé pour la sécrétion de GH (Dezaki et al. 2007). La repolarisation rapide des cellules raccourcit la durée du potentiel d'action et atténue l'augmentation du Ca^{2+} par le glucose, résultant en une diminution de la sécrétion d'insuline. La ghréline semble donc induire différents mécanismes de signalisation spécifiques au tissu ciblé et le mécanisme alternatif dans les cellules β est conséquent de l'absence d'expression de $G\alpha_{i1}$ (Astesano et al. 1999; Skoglund et al. 1999). La déacyl-ghréline n'a aucun effet sur la sécrétion d'insuline des cellules du pancréas (Dezaki et al. 2006). Sur le pancréas isolé, l'antagoniste du GHS-R1a, D-Lys³-GHRP-6, augmente la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, ce qui impliquerait l'activation constitutive du

récepteur dans la modulation de la sécrétion d'insuline par le pancréas (Asakawa et al. 2003; Dezaki et al. 2006).

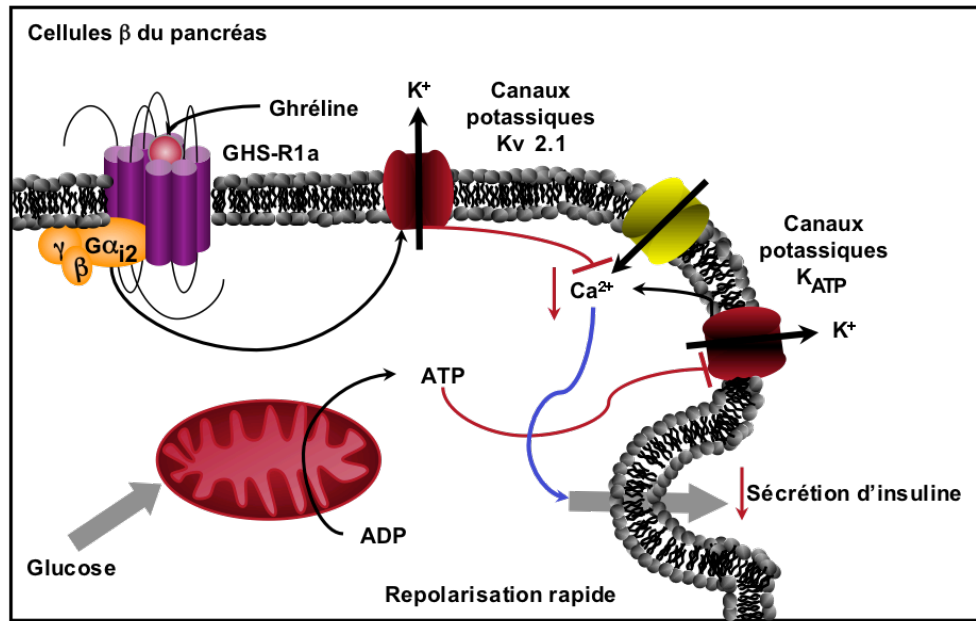


Figure 10 : Actions de la ghréline sur les cellules pancréatiques

La ghréline agit aussi sur la gluconéogenèse hépatique, qui est cruciale dans le maintien de l'homéostasie du glucose. L'enzyme limitante de la gluconéogenèse, phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), est diminuée par l'insuline au niveau transcriptionnel. Dans les cellules d'hépatomes de rat, la ghréline renverse l'effet inhibiteur de l'insuline sur PEPCK et augmente ainsi la gluconéogenèse (Murata et al. 2002). L'ensemble de ces données suggère un lien fonctionnel entre la ghréline, le pancréas endocrine et le métabolisme du glucose. Néanmoins, l'importance du rôle physiologique et pathophysiologique de ce lien demeure obscure.

1.5.4 Action cardiovasculaire

La ghréline exerce de nombreux effets sur le système cardiovasculaire. Les plus importants sont la vasodilatation, la protection contre l'ischémie cardiaque (Frascarelli et al. 2003; Nagaya and Kangawa 2003), l'inotropisme et également les effets anti-apoptotiques sur les cardiomyocytes (Baldanzi et al. 2002) et les cellules endothéliales (Kleinz et al. 2006; Lin et al. 2004).

Des effets hémodynamiques bénéfiques de la ghréline ont également été observés chez l'homme suite à la réduction de la postcharge cardiaque et l'augmentation du débit systolique : la diminution de la pression artérielle, la diminution de l'index cardiaque et l'augmentation de la fraction d'éjection systolique ventriculaire gauche. Ces effets pourraient être reliés à l'inhibition de l'activité nerveuse sympathique par la ghréline puisqu'ils sont parfois associés à une augmentation plasmatique de la norépinéphrine (Nagaya et al. 2004). La ghréline a ainsi été proposée pour le traitement de la défaillance cardiaque chronique lors de laquelle elle atténue le développement de la cachexie cardiaque (Nagaya and Kangawa 2006).

On note également un potentiel thérapeutique de la ghréline pour corriger la dysfonction endothéliale associée aux maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, puisque la ghréline améliore la fonction endothéliale et inhibe les changements proathérogéniques (Shimizu et al. 2003b; Tesaro et al. 2005). Plus spécifiquement sur les cellules endothéliales aortiques, la ghréline active rapidement l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) et la production de NO de façon spécifique à l'activation du GHS-R1a (Iantorno et

al. 2007). L'activation de la eNOS dépend de G_q , de l'AMPK et de PI3-K/Akt et est cruciale dans l'inhibition de l'inflammation vasculaire (Xu et al. 2008). La ghréline inhibe également la migration des cellules endothéliales induite par l'angiotensine (Rossi et al. 2007) et a un effet anti-apoptotique sur les cardiomyocytes par activation de l'AMPK (Chang et al. 2004; Frascarelli et al. 2003; Hutchinson et al. 2008; Mladenov et al. 2008).

1.5.5 Effets immunomodulateurs

1.5.5.1 Action anti-inflammatoire de la ghréline

La ghréline module la fonction immunitaire de deux façons. D'abord elle favorise la division cellulaire lymphoïde (Koo et al. 2001) et ensuite elle inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages infiltrés au niveau de différents tissus impliqués dans plusieurs pathologies comme l'arthrite, l'inflammation pulmonaire et l'infection bactérienne (Gao et al. 2009).

De façon plus détaillée, l'activation du GHS-R1a par la ghréline inhibe spécifiquement et sélectivement l'expression et la production des cytokines inflammatoires interleukines-1 β (IL-1 β), -1 α (IL-1 α) et -6 (IL-6) et du facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) par les cellules T et les monocytes circulants (Dixit et al. 2004). La ghréline inhibe également NF κ B dans les cellules endothéliales (Li et al. 2004) et les macrophages pulmonaires, ce qui diminue l'inflammation pulmonaire aiguë (Chen et al. 2008; Wu et al. 2007). La ghréline protège contre les infections induites expérimentalement en tuant directement les bactéries via l'inhibition de la sécrétion de High-Mobility Group Box 1 (HMGB1), sécrété

par les macrophages et agissant comme un facteur proinflammatoire tardif associé à un taux de mortalité élevé (Bianchi and Manfredi 2007; Chorny et al. 2008; Sunden-Cullberg et al. 2006).

1.5.6 Effet sur la prolifération : implication de la ghréline dans le cancer

La ghréline régule la prolifération de plusieurs types cellulaires. Un effet prolifératif est observé sur les cellules cancéreuses de la prostate (Jeffery et al. 2002), les kératinocytes (Groschl et al. 2005), les préadipocytes (Kim et al. 2004), les ostéoblastes (Maccarinelli et al. 2005; Sang Wan et al. 2005), les cellules endothéliales de l'aorte (Rossi et al. 2008), les cardiomyocytes et les cellules somatotrophes (Nanzer et al. 2004). À l'opposé, un effet anti-prolifératif est détecté dans les cellules cancéreuses du sein (Cassoni et al. 2001), les cellules musculaires lisses vasculaires (Rossi et al. 2009; Zhang et al. 2008) et les cellules de la thyroïde (Volante et al. 2003). De même, plusieurs types cellulaires néoplasiques synthétisent et sécrètent de la ghréline : les adénomes hypophysaires (Korbonits et al. 2001), les carcinomes gastroentéropancréatiques (Arnaldi et al. 2003), les tumeurs de la thyroïde (Volante et al. 2003), les tumeurs testiculaires (Jeffery et al. 2002), les carcinomes de la prostate (Cassoni et al. 2004), du poumon (Ghe et al. 2002), du sein (Cassoni et al. 2001), du pancréas (Duxbury et al. 2003) et du système ovarien/endométrial (Gaytan et al. 2003). De façon plus physiologique, un niveau élevé de ghréline sérique est observé chez les patients atteints de cancer du poumon accompagné de cachexie (perte de poids et atrophie musculaire) (Shimizu et al. 2003a). La présence du GHS-R1a et de la ghréline

dans ces types cellulaires suggère un rôle autocrine et paracrine de la ghréline dans la régulation de la prolifération cellulaire.

1.5.6.1 Activation de la voie des MAPKs dans l'effet prolifératif de la ghréline

La cascade de signalisation des MAPKs ERK est une des voies principales impliquées dans la signalisation mitogénique des GPCRs et elle permet à la ghréline de moduler la prolifération cellulaire (Meloche and Pouyssegur ; Rozengurt 1998). De façon générale, la signalisation par $G\alpha_{q/11}$ induit des réponses cellulaires diamétralement opposées puisque dans certains types cellulaires, elle est associée à la croissance et la différenciation cellulaires, alors que dans d'autres, elle est associée à la mort cellulaire. Ceci s'explique par une quantité croissante d'évidences qui indiquent que $G\alpha_q$ affecte aussi la voie de signalisation de PI3-K/Akt, un important régulateur de la survie cellulaire (Kim et al. 2004). L'action de la ghréline implique ainsi une diversité et une complexité de cascades de signalisation ayant pour but de réguler la transcription des gènes et d'induire différents changements physiologiques influençant l'apoptose et la prolifération.

L'activation de la voie classique d'activation $G\alpha_{q/11}$ -PLC- Ca^{2+} /PKC par la ghréline active la voie des MAPKs soit par l'intermédiaire de Ras ou indépendamment de Ras. Tel qu'illustré à la Figure 11 (A) (p.35), certaines isoformes de PKCs (α , ϵ et η) phosphorylent et activent directement c-Raf (Liebmann 2001; Schonwasser et al. 1998) alors que d'autres isoformes (PKC β et δ) activent plutôt Ras. Ras active Raf-1 et la MAP kinase kinase 1, MEK, un activateur spécifique de ERK. Aussi, une seconde voie d'activation, dite tardive, de ERK par la ghréline implique les β -arrestines qui, lors de l'endocytose du GHS-R1a,

forment une plateforme avec Raf-1 et MEK. Dans les adipocytes, l'interaction du GHS-R1a avec les β -arrestines active plutôt la kinase Akt par l'intermédiaire de c-Src (Figure 11 (B)) (Lodeiro et al. 2009). Finalement, l'activation de ERK par la ghréline est observée dans les cellules de la glande surrénale et elle résulte de la transactivation d'un récepteur tyrosine kinase (Figure 11 (C), ci-dessous) (Mazzocchi et al. 2004).

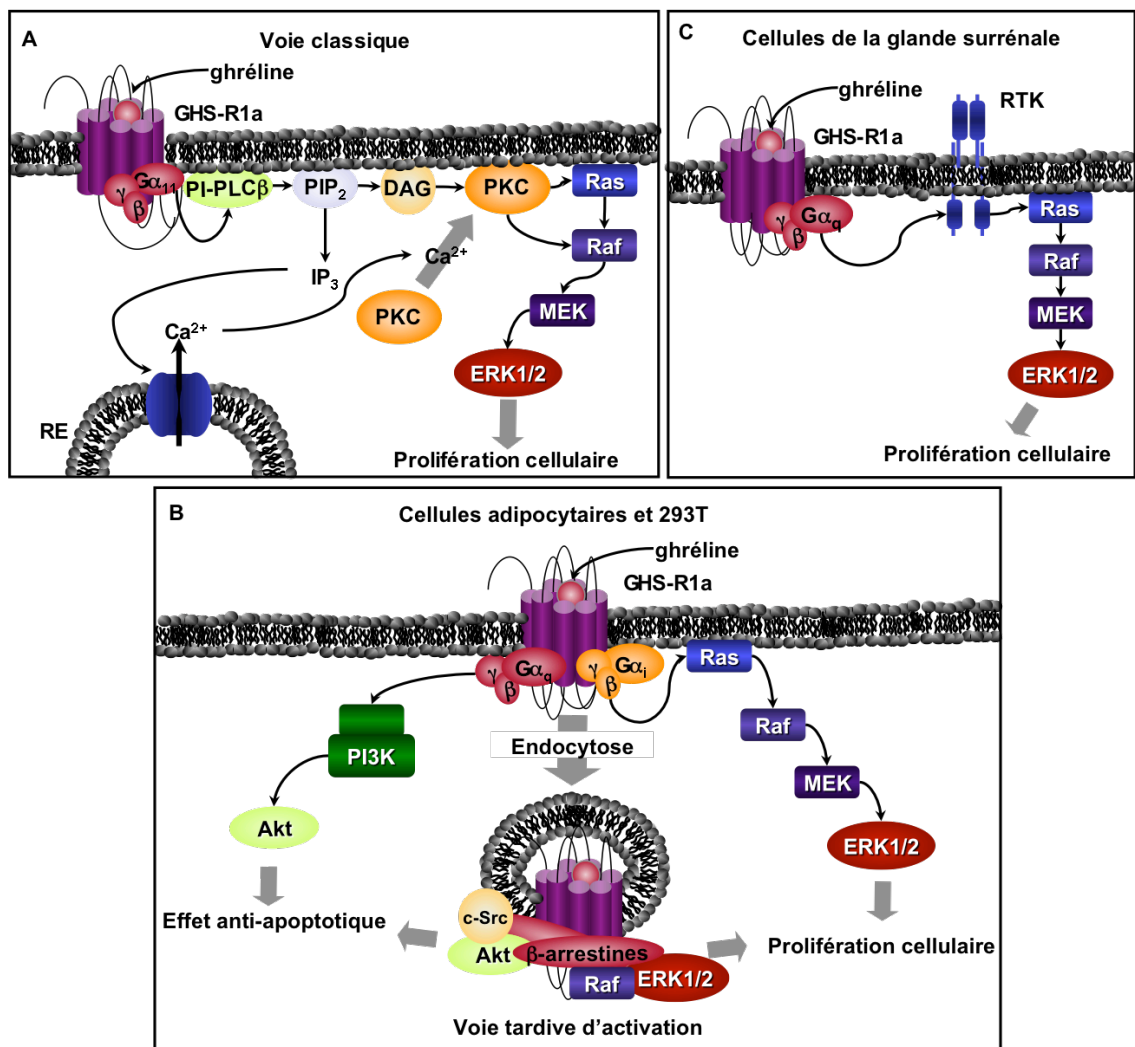


Figure 11 : Régulation de la voie des MAPKs par la ghréline

D'autres mécanismes de signalisation sont impliqués dans la régulation de l'apoptose par la ghréline. La ghréline est anti-apoptotique dans les cellules β (Granata et al. 2007) du pancréas et les cellules de la zone glomérulée des surrénales (Yang et al. 2007a), où elle active HSP70, qui inhibe la kinase 1 régulatrice du signal de l'apoptose (ASK-1) (Mazzocchi et al. 2004). Sur les cellules musculaires lisses vasculaires, la ghréline a plutôt un effet anti-prolifératif par l'activation de l'AMPC et PKA (Rossi et al. 2009). Par ailleurs, certains des effets de la ghréline semblent être indépendants de la présence du GHS-R1a, par exemple l'effet prolifératif sur les ostéoblastes (Delhanty et al. 2006) et l'effet anti-apoptotique sur les cardiomyocytes (Baldanzi et al. 2002).

1.5.7 Autres effets de la ghréline

Effets gastrointestinaux

Étant donné sa localisation dans les cellules A de l'estomac, il est peu surprenant que la ghréline affecte plusieurs aspects de la fonction gastrointestinale. La ghréline stimule la sécrétion gastrique, accélère la vidange gastrique ainsi que la motilité du colon, ce qui accélère la procession des aliments et accompagne l'effet orexigène (Shafton et al. 2009; Shimizu et al. 2006; Tack et al. 2006; Tack et al. 2005). L'activité motrice sur le tractus gastrointestinal passe en partie par les neurones à NPY et le nerf vague.

Effets sur le système reproducteur

Au niveau central, la ghréline supprime la sécrétion pulsatile de l'hormone lutéinisante (LH). Au niveau périphérique, la ghréline diminue l'expression du facteur de cellules

souches (SCF) un médiateur clé de la spermatogenèse (Barreiro et al. 2004) et inhibe la sécrétion stimulée de testostérone (Tena-Sempere et al. 2002). La ghréline est produite par les gonades et le GHS-R1a est exprimé dans l'ovaire et les cellules de Leydig et de Sertoli du testicule (Barreiro et al. 2004). Elle pourrait donc présenter un rôle régulateur de la fonction reproductrice.

Effet sur la physiologie de l'os

La ghréline stimule la prolifération et la différenciation cellulaires des ostéoblastes, augmente l'activité de la phosphatase alcaline et l'accumulation de calcium dans la matrice primaire (Malagon et al. 2003). Elle augmente aussi la densité minérale des os et ce même chez les animaux déficients en GH (Fukushima et al. 2005). Par conséquent, la ghréline semble stimuler directement la formation osseuse.

1.6 Les souris déficientes en ghréline et en GHS-R1a

Afin d'évaluer l'importance du récepteur GHS-R1a dans les activités biologiques de la ghréline et de juger l'étendue des actions du système ghréline/GHS-R, les gènes encodant pour la ghréline (*Ghrl*^{-/-}) et son récepteur (*Ghsr*^{-/-}) ont été invalidés chez la souris. À prime abord, ces animaux ne présentent aucun phénotype particulier en termes de croissance, d'appétit, d'adiposité et de dépense énergétique indépendamment de la nature de leur diète alimentaire (Sun et al. 2003b; Sun et al. 2006; Wortley et al. 2004). D'autres groupes ont montré que les souris *Ghsr*^{-/-} et *Ghrl*^{-/-} résistent au développement de l'obésité induite par une diète riche en gras lors de la période post-sevrage spécifiquement (agées de 4-6

semaines). Ces mêmes animaux deviennent obèses s'ils sont mis sur cette même diète à l'âge adulte (Wortley et al. 2005; Zigman et al. 2005). La ghréline serait donc impliquée dans le développement de voies métaboliques centrales et périphériques, mais en son absence le développement de mécanismes compensatoires permettrait aux animaux *Ghr1^{-/-}* de maintenir un poids normal et une sensibilité à une diète riche en gras malgré l'absence d'un système orexigénique fonctionnel. La souris *Ghr1^{-/-}* présentent aussi une sécrétion accrue d'insuline en réponse à la stimulation par le glucose ainsi qu'une amélioration de la sensibilité périphérique à l'insuline. Ces résultats supportent une fonction primaire de la ghréline chez les souris adultes pour moduler la sensibilité à l'insuline (Sun et al. 2008). De plus, l'ensemble de ces travaux suggère que l'absence de ghréline soit majoritairement compensée durant l'embryogenèse.

1.7 Hétérogénéité de la ghréline et de son récepteur

Depuis sa découverte en 1999, la ghréline a suscité un grand intérêt et est devenue un sujet important de la recherche scientifique. Le large spectre d'expression du GHS-R1a laisse présager une implication dans une diversité de fonctions physiologiques. Effectivement, en plus des effets initiateurs de la sécrétion de l'hormone de croissance, la ghréline influence la prise de nourriture, le métabolisme énergétique, la fonction cardiovasculaire, la prolifération et la différenciation cellulaires, la réponse immunologique et la fonction reproductrice. De nombreuses évidences permettent de croire que le récepteur GHS-R1a seul ne peut être responsable de la totalité de ces effets. L'étude des souris déficientes en GHS-R1a ne montra pas d'anomalies évidentes de croissance, ni de différences dans

l'induction de l'obésité, suggérant l'implication d'un autre récepteur. D'autres évidences supportant l'existence d'un second récepteur sont que la ghréline active une grande variété de voies de signalisation intracellulaires et que, tel qu'indiqué dans le Tableau II : (p.11), certains de ces mécanismes ne requièrent pas la présence du GHS-R1a. De plus, certaines activités biologiques de la ghréline sur le cœur, le tissu adipeux, le pancréas, les cellules cancéreuses et le cerveau sont mimées par la déacyl-ghréline, sans affinité de liaison pour le GHS-R1a. Ceci suggère l'existence potentielle d'un autre récepteur non identifié à ce jour, qui posséderait un site de liaison fonctionnel pour la ghréline et ses dérivés.

Il demeure encore plusieurs questions au sujet de la ghréline et son(ses) récepteur(s), par exemple : 1- distinguer les effets pharmacologiques des effets physiologiques de la ghréline, 2- déterminer le rôle paracrine/autocrine de la ghréline, 3- déterminer la relation entre les fonctions de la ghréline et celles de la déacyl-ghréline et leur équilibre physiologique, 4- identifier le récepteur de la déacyl-ghréline. Ces interrogations seront probablement résolues dans un avenir rapproché et les réponses nous aideront à déterminer avec exactitude le rôle physiologique, pathologique ainsi que le potentiel thérapeutique et clinique de ce nouveau système.

1.8 Ciblage thérapeutique du GHS-R1a et de la ghréline

Étant donné le vaste spectre d'activités biologiques influencé par la ghréline, il est apparent que la découverte de la ghréline et de son récepteur ont ouvert plusieurs avenues pour la recherche neuroendocrine et métabolique et a influencé plusieurs domaines de la médecine telle la gastroentérologie, l'oncologie et la cardiologie. Il est de ce fait fort probable que le

développement de ligands du GHS-R1a de type agoniste, agoniste inverse, agoniste partiel ou antagoniste, aurait des applications cliniques et thérapeutiques. Encore aujourd'hui, il apparaît difficile de discerner clairement tous les effets physiologiques de la ghréline, puisque les sites d'action de cette dernière sont si nombreux que certains effets mettent en jeu plusieurs systèmes physiologiques périphériques et centraux. À cet effet, une fine compréhension de ces mécanismes d'action est primordiale.

2 Une autre cible des GHSs : Le récepteur CD36

Le CD36 a été identifié comme autre cible des GHSs au niveau cardiaque (Bodart et al. 2002) et plusieurs effets cardioprotecteurs directs des GHSs seraient médiés spécifiquement par ce récepteur (Marleau et al. 2006). Le CD36 est un récepteur de type « scavenger » de classe B; il est considéré comme un récepteur multi-ligands multifonctionnel. Savill et ses collègues ont été les premiers à attribuer un rôle au CD36 dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes mononucléaires (Savill et al. 1991). Le CD36 a été impliqué dans de nombreux aspects de la biologie, notamment :

- **L'angiogenèse :** La thrombospondine-1 (TSP-1) a été identifiée comme un inhibiteur endogène de l'angiogenèse tumorale par Bouck et ses collaborateurs (Good et al. 1990), qui confirmèrent ensuite l'implication du CD36 dans la médiation du signal antiangiogénique (Jiménez et al. 2000). La TSP-1 inhibe l'angiogenèse en induisant l'apoptose des cellules endothéliales activées.
- **L'athérogenèse :** Le CD36 du macrophage lie et internalise les lipoprotéines de faible densité oxydées (LDLox) (Endemann et al. 1993).
- **L'infection bactérienne :** Le CD36 est un senseur des diacylglycérides microbiens en formant un complexe avec l'hétérodimère Toll Like Receptor-2 (TLR2)/TLR6 (Hoebe et al. 2005).
- **La biologie des plaquettes :** Le CD36 est impliqué dans l'adhérence et l'agrégation des plaquettes (Tandon et al. 1989).

- **La lipidoréception:** Le CD36 exprimé sur la partie apicale de certaines cellules neurosensorielles des bourgeons du goût permet de percevoir et d'apprécier le goût lipidique des aliments (Laugerette et al. 2005).
- **La parasitologie :** Le CD36 est responsable de la cytoadhérence des érythrocytes parasités par *Plasmodium falciparum* (parasite de la malaria) (Serghides et al. 2003).
- **La phagocytose des cellules apoptotiques :** Le CD36 intervient dans la phagocytose et la dégradation quotidienne essentielle des fragments du segment externe des bâtonnets (ROS) par l'épithélium pigmentaire rétinien (Ryeom et al. 1996).
- **Le métabolisme et la fonction du muscle :** Le CD36 est responsable de la translocation de acides gras à longues chaînes dans les adipocytes, le cœur et le muscle squelettique (Abumrad et al. 1993).

Toutefois pour des raisons d'espace, nous discuterons en détail seulement de l'implication du CD36 dans l'internalisation des lipoprotéines et de son rôle dans le développement de l'athérosclérose. Son implication dans l'angiogenèse et la clairance des cellules apoptotiques ont été passés en revue dernièrement (Hazen 2008; Silverstein and Febbraio 2007).

2.1 Distribution tissulaire du CD36

Le CD36 fut caractérisé initialement à la surface des plaquettes/mégakaryocytes (Tandon et al. 1989). Sa distribution est néanmoins prédominante dans les tissus ayant une haute

capacité métabolique pour les acides gras (AGs) comme les adipocytes, le cœur et le muscle squelettique (Acton et al. 1994; Vannieuwenhoven et al. 1995). Le CD36 est également fortement exprimé dans les tissus sujets à d'importants flux d'AGs, comme les cellules endothéliales de la microvasculature (Swerlick et al. 1992), les cellules mammaires (Clezardin et al. 1993), les pneumocytes (Guthmann et al. 1999), les entérocytes du petit intestin (Chen et al. 2001), l'épithélium cilié du tractus respiratoire et le foie (Vosper et al. 2001). De plus, on le retrouve sur plusieurs types cellulaires impliqués dans le développement de l'athérosclérose, comme les monocytes/macrophages (Endemann et al. 1993), les lymphocytes B, les cellules musculaires lisses (de Oliveira Silva et al. 2008; Lim et al. 2006), ainsi que sur les cellules hématopoïétiques (incluant les précurseurs érythroïdes).

Le CD36 est colocalisé avec la cavéoline-1 dans les cavéoles, qui servent d'intégrateurs dans le transport cellulaire du cholestérol. Cette colocalisation semble faciliter l'intégration des cascades de signalisation déclenchées par le CD36, mais également celles qui sont déclenchées par la cavéoline-1 (Ring et al. 2006; Zeng et al. 2003).

2.2 Propriétés moléculaires du CD36

Le gène CD36 humain (*Cd36h*), situé sur le chromosome 7q11.2, est composé de 15 exons (Figure 12, p.44), dont 12 sont codants (boîtes rouges et orangées) (Fernandez-Ruiz et al. 1993). Les exons 1a, 1b, 1c, 1e et 1f (en bleu) servent tous de premiers exons alternatifs et sont régulés spécifiquement dans certains tissus (Andersen et al. 2006; Armesilla and Vega 1994; Sato et al. 2002; Zingg et al. 2002). La séquence nucléotidique prédit une protéine de

471 aa de poids moléculaire de près de 53 kDa. Toutefois, la présence de 10 sites de N-glycosylation sur le CD36 accroît le poids moléculaire de la protéine hautement glycosylée entre 78 et 90 kDa et protège par le fait même la protéine contre la protéolyse.

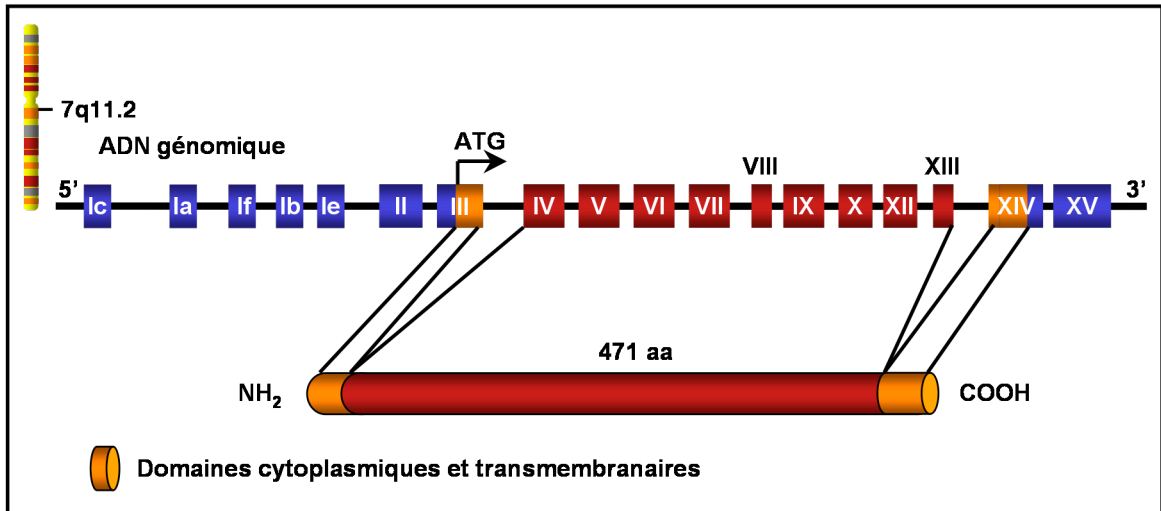


Figure 12 : Représentation schématique du gène *Cd36*

Le CD36, illustré à la Figure 13 (p.46), est constitué d'un long domaine extracellulaire enclavé de deux domaines transmembranaires, qui eux sont suivis de deux courts domaines (9 et 13 aa) cytoplasmiques palmitoylés. La palmitoylation (sites violets, Figure 13) est essentielle au positionnement de CD36 dans les calvéoles et les radeaux lipidiques (Tao et al. 1996). Différents domaines fonctionnels ont été identifiés sur le CD36. La partie extracytosolique comprend une poche hydrophobique [184-204] (bleu), qui est probablement associée à la membrane cellulaire externe et un domaine immunodominant composé des résidus [155-183] (rouge foncé) impliqué dans la liaison des LDLox, des produits terminaux de glycation (AGEs), des cellules apoptotiques et également des GHSs

(Demers et al. 2004; Navazo et al. 1996a; Ohgami et al. 2001). Plus précisément, la méthionine 169 (encerclée de vert) semble être impliquée dans la liaison entre le GHS hexaréline et le CD36 (Demers et al. 2004). Deux autres sites de liaison des LDLox ont aussi été rapportés pour les domaines composés des aa [28-93, 120-155] (Pearce et al. 1998) et plus spécifiquement, les lysines 164 et 166 du CD36 semblent être essentielles à la liaison des LDLox (Kar et al. 2008).

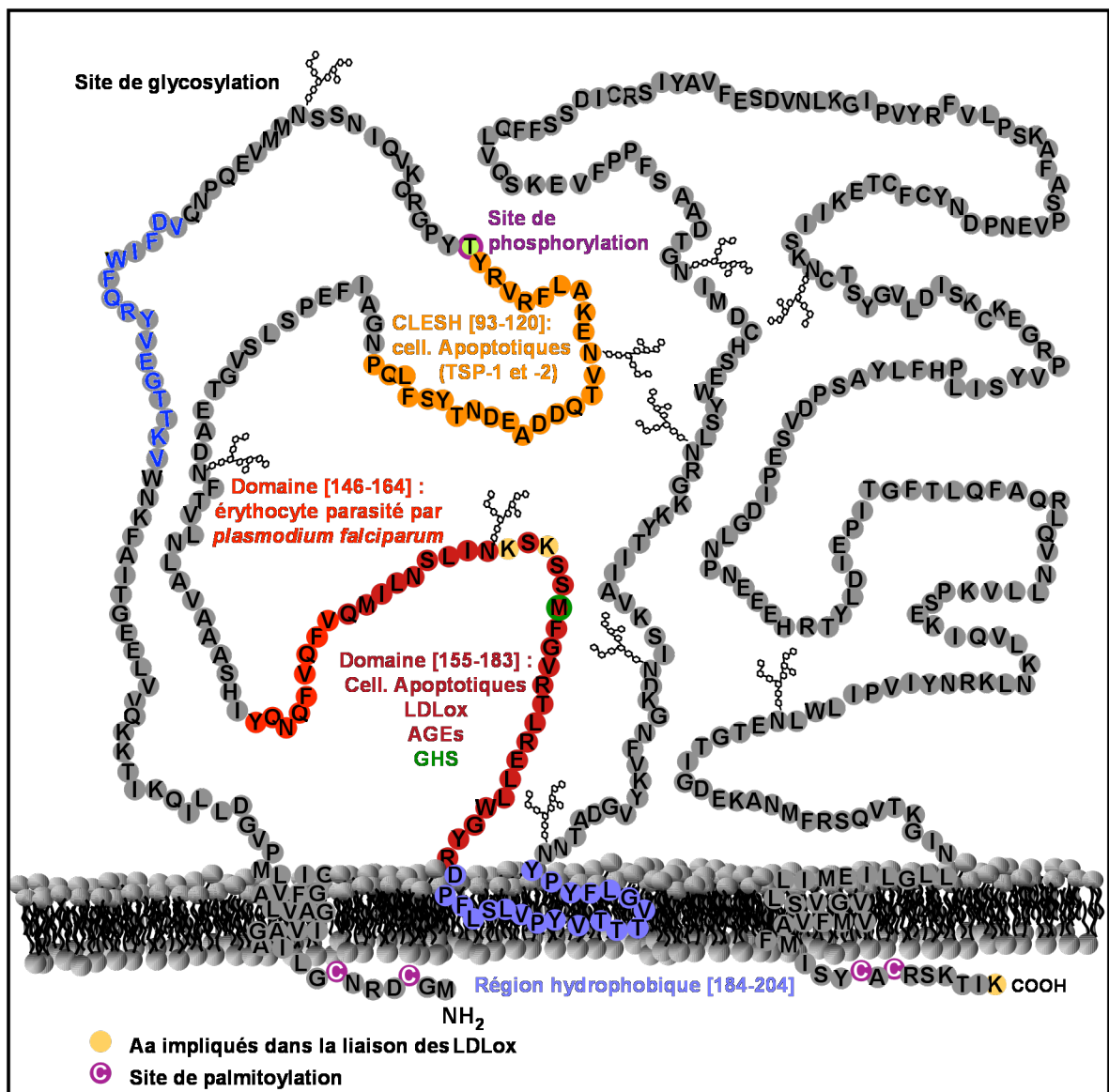


Figure 13 : Représentation schématique du CD36 et de ses sites de liaison

Le domaine C-terminal semble lui aussi impliqué dans la liaison, la capture et la dégradation des LDLox, puisqu'une simple délétion du dernier acide aminé K471 réduit de façon significative l'interaction CD36-LDLox (Malaud et al. 2002). Un autre motif fonctionnel est appelé le domaine CLESH (séquence d'homologie CD36, LIMP-II, Emp,

SR-BI), composé des résidus [93-120, 155-183] (orangé), est impliqué dans la reconnaissance et l'endocytose des cellules apoptotiques (Eto et al. 2003). Lors de ce processus d'endocytose, le CD36 coopère avec le récepteur de la vitronectine $\alpha_v\beta_3$ pour la reconnaissance de la TSP-1 liée à surface des cellules en apoptose (Navazo et al. 1996b; Sipes et al. 1999). Un dernier domaine d'intérêt, délimité par les aa [146-164] (rouge), permet la reconnaissance d'une protéine exprimée spécifiquement à la surface des érythrocytes parasités par *Plasmodium falciparum* (l'agent pathogène de la malaria). Une propriété intéressante du CD36 est son ectophosphorylation constitutive sur la thréonine 92 (en jaune) qui s'avère être essentielle pour la liaison de certains ligands (Asch et al. 1993; Hatmi et al. 1996; Ho et al. 2005).

Le CD36 est également un récepteur de signalisation. La queue cytoplasmique du CD36 s'associe avec des protéines à activité tyrosine kinase de la famille Src (Yes, Fyn, Lyn) dans les plaquettes, les cellules endothéliales de la microvasculature et les cellules de la microglie (Huang et al. 1991; Moore et al. 2002). L'activation du CD36 par le LDLox, la TSP-1 et la β -amyloïde active, via les Src, les MAPKs JNK2, p38 ou ERK1/2 qui sont d'importants initiateurs, respectivement, de la formation des cellules spumeuses, de l'apoptose et de la migration des cellules microgliales (Jiménez et al. 2000; Rahaman et al. 2006; Stuart et al. 2007).

2.3 Implication particulière de CD36 dans le développement de l'athérosclérose

2.3.1 La formation des lésions athéromateuses

L'athérosclérose se développe suite à des interactions pathogéniques entre les facteurs hémodynamiques, les lipoprotéines circulantes, le système immunitaire et la paroi artérielle. Les sites privilégiés de la formation de la plaque d'athérome sont les embranchements des vaisseaux de gros calibre, qui correspondent aux zones de turbulence du courant sanguin où les forces hémodynamiques altèrent les propriétés de l'endothélium. Les premières lésions caractéristiques de l'athérosclérose sont les stries lipidiques, formées par l'accumulation subendothéliale de macrophages engorgés de LDL ayant subi des modifications d'oxydation (LDLox) et de lymphocytes T dans l'intima (Daugherty and Roselaar 1995). Les macrophages internalisent et accumulent massivement dans leur cytoplasme certaines composantes des LDLox via les récepteurs de type scavenger, dont le CD36, devenant alors des cellules spumeuses (Endemann et al. 1993). De plus, les macrophages initialement recrutés pour assurer la clairance des LDLox de la paroi vasculaire, contribuent eux-mêmes à l'oxydation des LDLs (Fuhrman et al. 1997). Ces LDLox stimulent alors l'expression d'agents chimiotactiques tel la protéine-1 chimiotactique du macrophage (MCP-1) et l'IL-8 au niveau endothélial qui recrutent d'autres monocytes circulants vers les sites inflammatoires (Boullier et al. 2001).

L'adhérence des monocytes circulants aux cellules endothéliales activées et leur extravasation dans l'espace sous-endothélial sont également liés à l'apparition ou l'augmentation d'expression successive de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales : la sélectine-P, la sélectine-E, la molécule d'adhésion intracellulaire (ICAM) et la molécule d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM), qui interagissent avec les monocytes via un certain nombre de molécules d'adhérence de la famille des $\beta 2$ des intégrines (CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18). Le monocyte activé sécrète aussi des messagers chimiques qui sont dirigés contre les différents acteurs cellulaires de l'athérosclérose comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires vasculaires lisses (VSMCs), les lymphocytes, les plaquettes et les macrophages eux-mêmes (Reape and Groot 1999).

La progression du processus de développement des stries lipidiques incluent une migration des cellules musculaires lisses (stimulée par PDGF, TGF- β , bFGF), une activation des lymphocytes T (médiée par TNF- α , IL-2, GM-CSF), l'adhérence et l'agrégation des plaquettes (stimulées par les intégrines, la sélectine-P, la fibrine, la TXA₂ et le facteur tissulaire). Par conséquent, l'accumulation des lipoprotéines modifiées au sein de l'endothélium provoque une activation excessive des mécanismes de prolifération cellulaire et inflammatoires (Hansson 2001).

Les stries lipidiques sont les précurseurs des lésions fibro-lipidiques plus complexes caractérisées par une accumulation des débris nécrotiques riches en lipides et de VSMCs. Les cytokines et les facteurs de croissance sécrétés par les cellules T et les macrophages

provoquent la migration des VSMCs de la média vers l'intima où elles vont, à l'image du macrophage, accumuler du cholestérol et devenir des cellules spumeuses dérivées des cellules musculaires lisses (Loppnow et al. 2008). Les VSMCs produisent également de la matrice extracellulaire qui forme une chape fibreuse protectrice qui enclôt le noyau nécrotique riche en lipides et forme une barrière entre la lumière du vaisseau et l'athérome. Ces lésions sont en constant accroissement, causé par l'accumulation des macrophages ainsi que par l'adhésion et l'extravasation continues des leucocytes par les mêmes facteurs que ceux décrits plus haut (MCS-F, MCP-1, LDLox,...). Les plaques d'athérome deviennent alors des entités très complexes pouvant évoluer vers la formation des plaques fibreuses.

La rupture de la chape fibreuse ou l'ulcération de la plaque fibreuse peut mener à la formation d'un thrombus, ce qui survient généralement à des endroits où la chape fibreuse est amincie. Cet amincissement est dû à la relâche de métalloprotéinases et autres enzymes protéolytiques par les macrophages qui dégradent la matrice extracellulaire et provoquent ainsi l'exposition du noyau nécrotique à la circulation artérielle. Les complications ischémiques sont liées au contact des plaquettes circulantes avec des molécules hautement thrombogènes tel le facteur tissulaire (Mach et al. 1997). Cette plaque est également fragilisée suite à la disparition des cellules musculaires lisses par apoptose induite par les leucocytes résidants et à l'augmentation du nombre de cellules spumeuses au bord des plaques fibreuses. Ce type de plaque est très vulnérable et présente un risque important de

rupture. Aucune molécule n'est présentement disponible pour empêcher la formation, l'évolution et la pérenité de la plaque d'athérome (Shah 1998).

2.3.2 Implication du CD36 dans le développement de l'athérosclérose

Les récepteurs scavengers CD36 et SR-A, exprimés à la surface du macrophage, sont les deux principaux récepteurs responsables de l'internalisation des LDLox (Kunjathoor et al. 2002). L'observation par Endemann et *coll.* que le CD36 est un des récepteurs des LDLox a déclenché une multitude d'études ayant pour but de déterminer son implication dans le développement de l'athérosclérose (Endemann et al. 1993).

Febbraio *et coll.* ont montré que la délétion du gène *Cd36* chez les souris déficientes en apolipoprotéine E (apoE) soumises à une diète athérogène riche en cholestérol et en lipides produit une réduction significative, de près de 80%, de la taille des lésions aortiques. Cette réduction est associée à une diminution de 60% de l'internalisation des LDLox par les macrophages (Febbraio et al. 1999; Febbraio et al. 2000). Dans ce même modèle déficient en apoE, une réduction de la taille des lésions est obtenue suite au traitement avec un ligand du CD36, le EP80317 (Marleau et al. 2005). Chez l'homme, les monocytes/macrophages des individus Nak^a-négatifs (déficients en CD36) lient le LDLox, l'internalisent et accumulent des esters de cholestérol dans une proportion de 40-60 % moindre que les cellules d'individus normaux (Nozaki et al. 1995). Cette fonction du CD36 pour l'internalisation des LDLox suggère un rôle critique de ce récepteur scavenger dans l'initiation, la perpétuation et la progression de lésions vasculaires (Janabi et al. 2000).

2.3.3 Nature de l'interaction LDLox-CD36

Les particules de LDLox sont constituées d'une fraction lipidique, composée essentiellement de phospholipides à la surface des particules et de lipides neutres au centre, et d'une fraction protéique formée par l'apoprotéine B (ApoB). La nature exacte des constituants des LDLox liant le CD36 a récemment été identifiée comme étant une espèce tronquée de phospholipides portant spécifiquement un acide gras avec un groupement carbonyle insaturé présentant un groupe γ -hydroxy(ou oxo)- α,β estérifié en position *sn*-2 (Podrez et al. 2003; Podrez et al. 2002). Ces dérivés de LDLox lient le CD36 sur un domaine de liaison formé par un regroupement de résidus lysines, chargées positivement, qui interagissent spécifiquement avec les charges négatives des LDLox (Doi et al. 1993). Les LDLox ainsi liés au CD36 subissent l'endocytose par un mécanisme impliquant les radeaux lipidiques et la dynamine (Sun et al. 2007). Ce mécanisme semble être indépendant des cavéoles et des puits de clathrine (Zeng et al. 2003).

L'endocytose des LDLox induit d'importants et complexes changements transcriptionnels dans le monocyte qui provoquent la différenciation du monocyte en macrophage. De plus, Aviram et *coll.* ont déterminé que cette différenciation requiert l'activation du récepteur du facteur stimulant la prolifération des macrophages (M-CSF) (Fuhrman et al. 2008). Ces changements incluent une augmentation de l'expression du CD36 lui-même (Mikita et al. 2001) via l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ qui vient se lier à son élément de réponse spécifique (PPRE) sur le promoteur du CD36 (Tontonoz et al. 1998). Il se produit alors une internalisation massive des LDLox et par conséquent, un développement accru de

cellules spumeuses suite à l'expression augmentée du CD36 (Rahaman et al. 2006). De façon similaire, l'activation de PPAR γ peut induire l'expression du CD36 dans les cellules musculaires vasculaires lisses et stimuler ainsi leur différenciation vers un phénotype semblable à celui des cellules spumeuses (Lim et al. 2006).

2.3.4 Voies de signalisation activées par la liaison du LDLox sur le CD36

Le LDLox active les MAP kinases ERK, JNK et p38, mais seuls les rôles de p38 et JNK sont confirmés dans la signalisation suite à l'internalisation des LDLox par le CD36 (Rahaman et al. 2006; Zhao et al. 2002). Tel qu'illustré à la Figure 14 (p.54), Rahaman et *coll.* ont déterminé que l'activation de JNK, par l'intermédiaire de la tyrosine kinase Src, est essentielle à la formation des cellules spumeuses induite par le LDLox. La transactivation de PPAR γ par p38 augmente aussi l'expression du CD36 et forme ainsi une boucle d'autorégulation positive caractéristique dans la formation des cellules spumeuses. L'augmentation de l'expression du CD36 en réponse au LDLox semble impliquer également la kinase Akt (Munteanu et al. 2006) alors que la PKC est impliquée dans l'activation de PPAR γ par les LDLox via le CD36 (Feng et al. 2000) dans le macrophage. De plus, l'activation de la PKC suite à l'interaction LDLox-CD36 va également activer le facteur de transcription Nf- κ B (Han et al. 2000a; Lipsky et al. 1997) qui déclenchera la production d'une myriade de cytokines inflammatoires (Janabi et al. 2000) comme les TNF- α/β , l'IL-1 β , l'IL-6 et les interférons β et γ , qui amplifieront le phénomène inflammatoire local de la plaque d'athénome. De plus, l'apoptose des cellules spumeuses

présentes dans le site de la lésion est elle aussi dépendante de l'interaction LDLox-CD36 et cette fois par l'activation de la caspase-3 (Wintergerst et al. 2000). Finalement, la liaison du oxLDL au CD36 a aussi pour effet d'inhiber la migration des macrophages qui se retrouvent alors prisonniers de la plaque d'athérome. Cette inhibition dépend de la génération des ROS, de l'augmentation de la kinase d'adhésion focale et de la polymérisation de l'actine (Park et al. 2008). L'ensemble de ces mécanismes est illustré dans la Figure 14, ci-dessous.

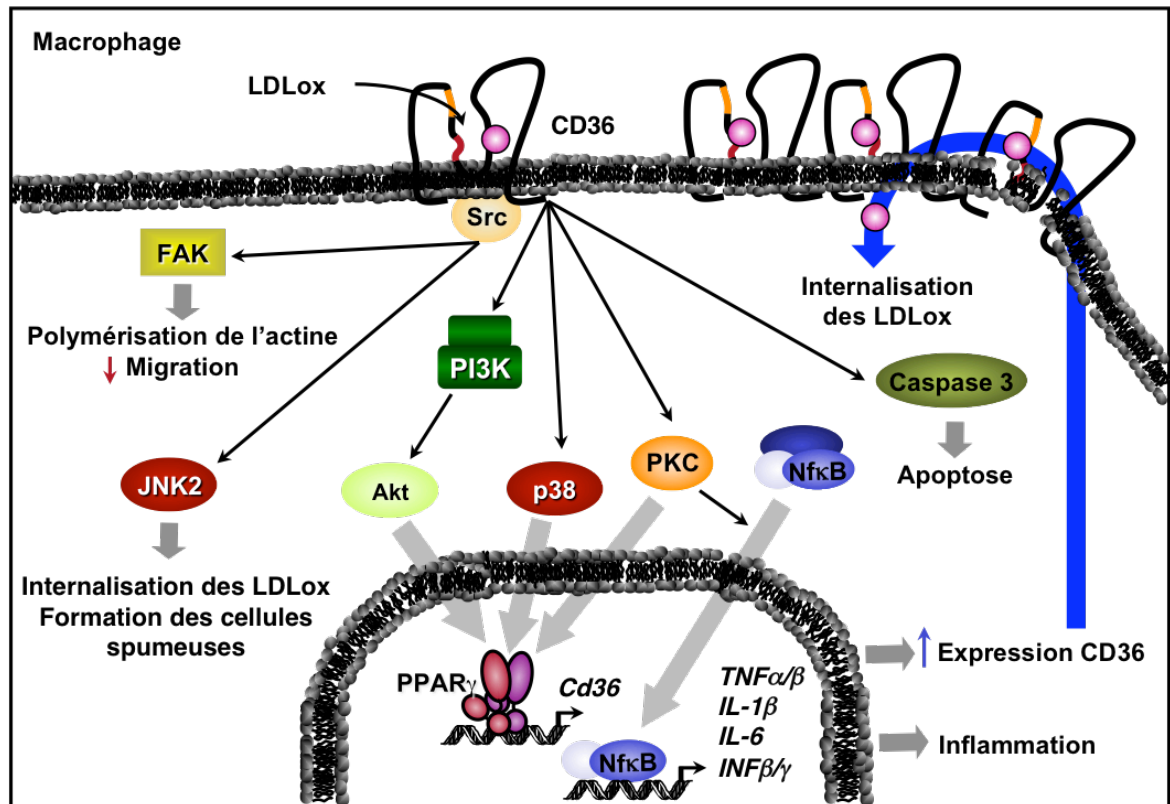


Figure 14 : Effets des LDLox sur le macrophage via le CD36

2.4 La régulation de l'expression du CD36

La régulation de l'expression du CD36 est complexe et résulte de l'interaction entre de multiples facteurs solubles et les molécules d'adhérence de la surface cellulaire (Huh et al. 1995; Yesner et al. 1996). Les spécificités tissulaire et cellulaire de l'expression du CD36 suggèrent également une régulation importante aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel, qui coïncide avec le stade de maturation de la cellule (Chen et al. 2001; Huh et al. 1995; Huh et al. 1996; Nicholson et al. 2000; Prieto et al. 1994). Les études sur la régulation de l'expression du CD36 touchent principalement les monocytes/macrophages, les plaquettes, les adipocytes ainsi que le muscle squelettique. Il appert qu'une multitude de ligands physiologiques et pharmacologiques utilisent la voie impliquant PPAR γ pour moduler l'expression du CD36 (Tontonoz and Nagy 1999). Une section complète de cette thèse sera consacrée à l'étude de la régulation de PPAR γ (Chapitre 3, p.59) et le Tableau IV (p.57) résume les ligands connus pour stimuler ou inhiber l'expression du récepteur CD36.

Brièvement, la régulation de l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire PPAR γ , et par conséquent le niveau d'expression du CD36, peut se produire par trois phénomènes:

- Premièrement par des modifications post-traductionnelles de PPAR γ . Certains ligands inhibiteurs de l'expression du CD36, tel les facteurs de croissance transformant $-\beta 1$ et $-\beta 2$ (TGF- $\beta 1$ et TGF- $\beta 2$), agissent par une répression transcriptionnelle du PPAR γ suite à sa phosphorylation par une MAPK (Han et al. 2000b). Par ailleurs, on note une diminution de la quantité de TGF- $\beta 1$ actif et une

mutation du TGF- β 1-R de type II dans les plaques athérosclérotiques. Ceci suggère que la surexpression de CD36 dans les plaques athérosclérotiques pourrait être la conséquence d'une carence dans la signalisation induite par le TGF- β (Argmann et al. 2001; Grainger 2007).

- Deuxièmement par la liaison directe d'un ligand sur PPAR γ . Certains dérivés des LDLox, comme les acides hydroxyoctadécadiénoïque-9 et -13, (9- et 13-HODE) lorsqu'internalisées, lient et activent directement PPAR γ (Nagy et al. 1998).
- De façon similaire l'IL-4 augmente l'activité de l'enzyme 12/15-lipoxygénase, qui génère la formation des dérivés d'acides gras hydroxylés comme l'acide hydroxyeicosatétranoïque-15 (15-HETE) et le 13-HODE à partir respectivement des acides arachidonique et linoléique (Huang et al. 1999).
- Une autre façon de réguler le niveau d'expression du CD36 est la régulation du mouvement du CD36 emmagasiné dans les compartiments intracellulaires vers la membrane plasmique. Ce type de régulation se produit principalement dans le muscle squelettique lors d'une contraction musculaire ou encore suite à la stimulation par l'insuline (Ibrahimi et al. 1999). Par ailleurs, les patients obèses et résistants à l'insuline semblent présenter un dysfonctionnement du recyclage du CD36 avec ségrégation à la membrane plasmique des muscles cardiaque et squelettique, résultant en une accumulation accrue de triacylglycérol dans le cœur et une utilisation préférentielle des acides gras comme substrat énergétique au détriment du glucose (Bonen et al. 2004; Coort et al. 2004; Ouwens et al. 2007).

Tableau IV : Régulation de l'expression du CD36

	<i>Type cellulaire</i>	<i>Mécanisme d'action</i>
<i>Inducteurs de l'expression du CD36</i>		
Acide rétinoïque all-trans (Wuttge et al. 2001)	Macrophages	Activation des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR/RXR)
Ligand du récepteur farnésioïde X (FXR) (Mencarelli et al. 2009)	Macrophages	NA
Liaison sur l'endothélium activé (Huh et al. 1995)	Monocytes	Agit au niveau transcriptionnel
LDLox (9- et 13-HODE) (Nagy et al. 1998)	Macrophages	Activation directe de PPAR γ
4-Hydroxynonénal (Yun et al. 2009)	Macrophages	Activation de la 5-lipoxygénase par p38
IL-4 (Feng et al. 2000; Huang et al. 1999)	Macrophages	Induction de PPAR γ et de la 12/15-lipoxygénase
Les dérivés Thiazolidinediones (TZD) (Hirakata et al. 2004; Kolak et al. 2007; Llaverias et al. 2006; Wilmsen et al. 2003)	Macrophages Muscle squelettique Adipocytes	Activation directe de PPAR γ (ligands synthétiques pour le récepteur)
MCS-F (Yesner et al. 1996)	Macrophages	NA
Statines (Yano et al. 2007; Ye et al. 2007)	Macrophages Myocarde	Activation indirecte de PPAR γ par l'augmentation de la production de 15d-PGJ ₂
Insuline/glucose (Chen et al. 2006; Sampson et al. 2003; Yang et al. 2007b)	Adipocytes 3T3-L1 Coeur, intestin Monocytes	NA
<i>Répresseurs de l'expression du CD36</i>		
Dexaméthasone (Sun et al. 2003a; Yesner et al. 1996)	Adipocytes Monocytes/macrophages	(NA, indépendant de PPAR γ)
TGF- β 1 et TGF- β 2 (Han et al. 2000b)	Macrophages THP-1	Phosphorylation inhibitrice de PPAR γ par MAPK
Extrait proanthocyanidine de pépins de raisins (GSPE) (Bagchi et al. 2003)	Cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVECs)	NA
Statines (Bruni et al. 2005; Pietsch et al. 1996)	Monocytes Plaquettes	NA
α -tocophérol (Senthil Kumar et al. 2004)	Macrophages	Inhibition de la tyrosine kinase Tyk2
IL-10 (Rubic and Lorenz 2006)	Macrophages THP-1	Diminution de l'expression de PPAR γ

2.5 Les effets métaboliques de la variation de l'expression du CD36

2.5.1 La déficience en CD36 chez l'humain

Il existe deux types de déficience en CD36 chez l'humain: le type I, dans lequel ni les plaquettes, ni les monocytes n'expriment le CD36 et le type II caractérisé par une déficience seulement au niveau des plaquettes. Entre 2 et 3 % des populations japonaises, thaïes et africaines présentent une déficience en CD36 contre moins de 0.3% pour les descendants européens et américains (Ikeda et al. 1989; Yamamoto et al. 1990). L'impact physiologique de la déficience en CD36 de type I est une diminution de la capture des acides gras par le cœur (Fukuchi et al. 1999; Kintaka et al. 2002). Comme le métabolisme des acides gras au niveau cardiaque est le système majeur de production d'énergie en condition aérobie, certains patients déficients en CD36 sont sujets à des dommages myocardiques (Kushiro et al. 2005). De plus, la mauvaise utilisation des acides gras par le muscle des patients déficients en CD36 peut conduire à des hyperlipidémies, un métabolisme anormal du glucose et une résistance à l'insuline (Kuwasako et al. 2003; Masuda et al. 2008; Miyaoka et al. 2001). Par ailleurs, la liaison et la fonction d'adhésion des plaquettes déficientes en CD36 (déficience de type II) demeurent normales (Imai et al. 2002).

De nombreux polymorphismes de nucléotide unique (SNPs) ayant un impact physiologique significatif ont été identifiés dans le gène *Cd36* humain. Dans la population caucasienne, un

haplotype commun est associé à des niveaux d'acides gras et de triglycérides anormaux et à un risque augmenté de cardiopathies ischémiques. Dans la population française, une mutation rare dans le gène *Cd36* est liée avec la résistance à l'insuline (Leprêtre et al. 2004). Dans la population hollandaise, un SNP du promoteur *Cd36* est plus fréquent chez les patients diabétiques (Corpeleijn et al. 2006). Finalement, chez les individus de descendance africaine, plusieurs polymorphismes du *Cd36* semblent être corrélés avec des dyslipidémies ainsi qu'une susceptibilité à développer le syndrome métabolique (Love-Gregory et al. 2008).

Il apparaît donc que l'altération du gène *Cd36* est accompagnée de multiples facteurs de risques qui pourraient donner un fond génétique favorable au développement du syndrome métabolique et des maladies coronariennes chez l'homme.

3 Le récepteur nucléaire PPAR γ

Les récepteurs activés par les proliférateurs du peroxyosome (PPARs) constituent une sous-famille de la super-famille des récepteurs nucléaires. Trois isotypes, encodés par différents gènes, ont été identifiés : PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) et PPAR γ (NR1C3) (NuclearReceptorsNomenclatureCommittee 1999). PPAR α a été le premier isotype découvert comme cible moléculaire d'agents prolifératifs du peroxyosome hépatique (Issemann and Green 1990). Depuis, les PPARs ont été reliés à un extraordinaire éventail de fonctions cellulaires bien au-delà de la fonction pour laquelle ils ont été nommés. Chacun des isotypes de PPAR présente un patron d'expression tissulaire distinct relié avec

son rôle spécifique. L'expression de PPAR α prédomine dans le foie et le muscle squelettique, où il participe au catabolisme des acides gras (Auboeuf et al. 1997). Aussi, PPAR α active l'oxydation des acides gras dans le rein, le tissu adipeux brun et le cœur (Braissant et al. 1996). PPAR β/δ est ubiquitaire, mais présente des niveaux d'expression plus élevés dans le gros intestin, le placenta, le cœur, le muscle squelettique et le cerveau (Tan et al. 2004). Il semble lui aussi réguler la dépense énergétique et le métabolisme du glucose et des lipides, mais il présente également une fonction plus diversifiée dans le développement neuronal, l'inflammation et la réparation des plaies (Braissant et al. 1996; Burkart et al. 2007; Cimini et al. 2003; Fan et al. 2008; Wang et al. 2004b). Finalement, PPAR γ est exprimé principalement dans le tissu adipeux, les cellules endothéliales et les macrophages, où il joue un rôle majeur dans l'adipogenèse, la régulation de l'homéostasie des lipides et du glucose ainsi que dans le contrôle de la réponse inflammatoire (Kubota et al. 1999; Rosen et al. 1999; Szanto and Nagy 2008; Tontonoz et al. 1994b).

3.1 Les différents isoformes de PPAR γ et leur patron d'expression

Chez l'humain, il existe quatre ARNm différents de *Ppar gamma* dérivés du même gène, situé sur le chromosome 3p25, par usage alternatif du promoteur ou épissage alternatif de l'ARN. La transcription de *Ppar gamma-1*, *-3* et *-4* donne naissance à la protéine PPAR γ 1 (477 aa), tandis que la transcription de *Ppar gamma-2* (505 aa) mène à la production de la protéine PPAR γ 2 (Sundvold and Lien 2001). PPAR γ 2 possède ainsi 28 acides aminés supplémentaires à l'extrémité N-terminale (Fajas et al. 1998; Werman et al. 1997; Zhu et al.

1995) et il est représenté à la Figure 15 (ci-dessous). PPAR γ 1 est exprimé dans tous les tissus exprimant *Ppar gamma* : les tissus adipeux blanc et brun, les macrophages, le colon, l'endothélium vasculaire, le muscle squelettique, le rein et le pancréas (Braissant et al. 1996; Chawla et al. 2001; Escher et al. 2001; Vidal-Puig et al. 1996). L'expression de PPAR γ 2 est pour sa part confinée dans le tissu adipeux blanc (Fajas et al. 1998).

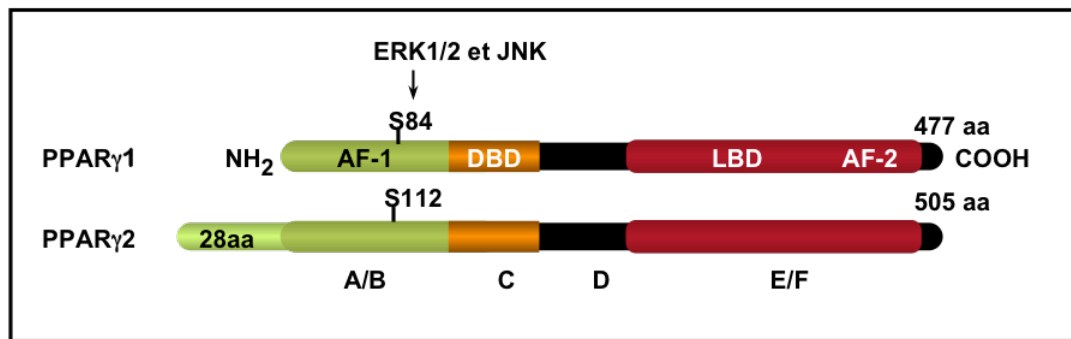


Figure 15 : Représentation schématique de PPAR γ

Par ailleurs, les embryons homozygotes déficients en *Ppar gamma* meurent *in utero* entre le 9^e et le 10^e jour de vie fœtale, ce qui implique un rôle important de PPAR γ dans la physiologie. Cette mort embryonnaire est due à l'implication de PPAR γ dans la différenciation terminale des trophoblastes ainsi qu'à des défauts de vascularisation du placenta menant à un sévère amincissement du myocarde (Barak et al. 1999).

3.2 Structure de PPAR γ

Comme tous les récepteurs nucléaires, les PPARs partagent une structure commune composée de domaines fonctionnellement distincts (Laudet et al. 1992) qui sont schématisés à la Figure 15 (ci-dessus). Le domaine A/B, situé à l'extrémité N-terminale, inclut la fonction d'activation indépendante du ligand (AF-1) (Werman et al. 1997).

PPAR γ 2 a une activité transcriptionnelle indépendante du ligand supérieure de 10 fois à celle de PPAR γ 1 (Werman et al. 1997). Quoique le rôle des 28 aa additionnels de PPAR γ 2 n'a pas été caractérisé, ce fragment pourrait lui conférer une activité accrue (Auwerx 1999). Le domaine C contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD) qui est formé par 2 motifs en doigt de zinc permettant au récepteur de lier une séquence spécifique PPRE (élément de réponse de PPAR) de la région promotrice de ses gènes cibles. Après la région charnière D, le domaine E/F contient le domaine de liaison du ligand (LBD) qui inclut une fonction d'activation dépendante du ligand (AF-2). Cette région est intimement impliquée dans la génération de surfaces de liaison pour les cofacteurs (Nolte et al. 1998). Le LBD est composé de 12 hélices- α et d'un petit feuillet- β de quatre brins (en jaune dans la Figure 16, p.63) qui s'assemblent pour créer une large poche hydrophobique (Uppenberg et al. 1998). La taille de cette poche permet d'accomoder la liaison d'une grande variété d'acides gras ainsi que leurs dérivés (Togashi et al. 2005). Dans cette structure, l'hélice 12 (en violet dans la Figure 16, p.63) recouvre la poche de liaison des ligands et crée ainsi une surface de liaison pour les cofacteurs (un peptide dérivé de cofacteur est coloré en orangé). Par ailleurs, la stabilisation de l'hélice 12 par l'agoniste est essentielle à la transactivation du récepteur (Kallenberger et al. 2003).

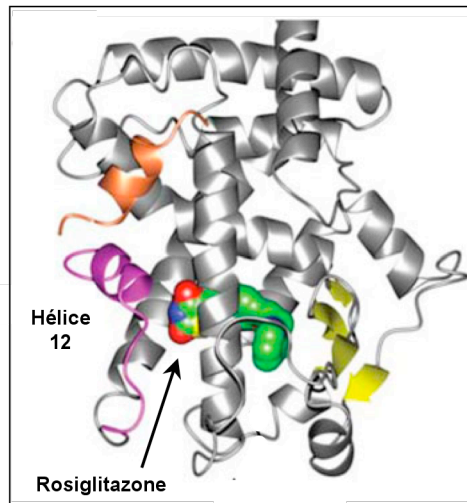


Figure 16 : Structure de la poche de liaison de PPAR γ

Nettles et al. (2008) Nat Struct & Mol Biol
15(9) : 893-895

3.3 Hétérodimérisation avec RXR et liaison à l'ADN

Les domaines C et E permettent également l'hétérodimérisation de PPAR avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR, NR2B) (Gearing et al. 1993; Miyata et al. 1994). Tout comme PPAR, il existe 3 isoformes de RXR, RXR α , β et γ qui sont activés par l'acide rétinoïque 9-cis. Tous ces isoformes forment un hétérodimère avec PPAR. L'association spécifique avec chacun des isoformes affecte la reconnaissance des promoteurs de gènes cibles (Juge-Aubry et al. 1997). En absence de ligand, l'hétérodimère est associé à un complexe de corépresseurs (coR) dans le noyau, lié ou non à l'ADN (Feige et al. 2005).

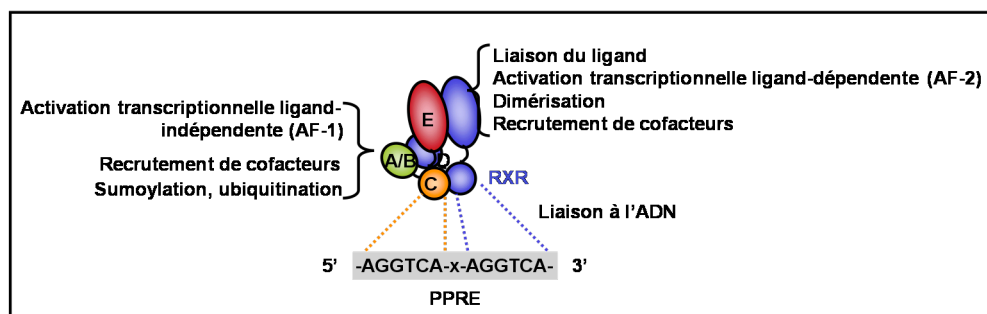


Figure 17 : L'hétérodimérisation de PPAR avec RXR

L'hétérodimère PPAR/RXR active la transcription en liant des éléments de réponse spécifiques situés en amont de leurs gènes cibles (Feige et al. 2005). Les éléments de réponse de PPAR (PPREs) sont constitués de deux demi-sites de répétition directe de la séquence consensus AGGTCA, séparés par un nucléotide (Palmer et al. 1995) sur lesquels PPAR et RXR occupent respectivement les hexamères en 5' et 3' (Figure 17, ci-dessus). Les nucléotides adjacents au PPRE, plus particulièrement ceux situés en 5', déterminent la sélectivité de la liaison des différents hétérodimères au PPRE (Juge-Aubry et al. 1997).

3.4 Régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ

L'activation de la transcription par PPAR γ se produit suite à la liaison d'un ligand, ou peut également résulter de modifications du récepteur par des mécanismes postraductionnels comme la phosphorylation, l'ubiquitination ou la sumoylation. L'activation de PPAR γ provoque un changement conformationnel qui induit la dissociation du complexe de coR et l'association de PPAR γ /RXR avec des coactivateurs (coA) et permet alors d'induire l'expression des gènes cibles.

3.4.1 Les ligands naturels de PPAR γ

Bien que les ligands endogènes spécifiques aux différents isoformes de PPARs ne soient très bien caractérisés, il semble que les acides gras à longues chaînes et leurs métabolites jouent le rôle d'agonistes endogènes (Forman et al. 1997). Les ligands naturels de PPAR- γ incluent les acides gras polyinsaturés (acides linoléique et arachidonique), des eicosanoïdes comme le 15-désoxy- Δ 12-14-prostaglandine J₂ (15d-PGJ₂) ainsi que des composants des lipoprotéines oxydées tels que les acides 9- et 13-HODE (Forman et al. 1995b; Kliewer et al. 1997). Étant donné que la majorité des ligands naturels activent PPAR γ à des concentrations micromolaires, leur concentration relative dans le noyau des cellules cibles et, par conséquent, leur capacité à activer PPAR γ est incertaine. Ainsi, bien qu'ils soient des agonistes de PPAR γ , les acides gras à longues chaînes et leurs métabolites possèdent une affinité plutôt faible et non sélective pour le récepteur et par conséquent, PPAR γ agit davantage comme un senseur physiologique général de lipides, ce qui lui permet d'intégrer le contrôle du métabolisme des lipides et du glucose et l'homéostasie énergétique.

3.4.2 Les ligands synthétiques de PPAR γ

Bien qu'un bon nombre de ligands synthétiques soient identifiés pour PPAR γ , les agonistes thiazolidinediones (TZD), qui sont utilisés présentement en clinique pour le traitement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2, demeurent les mieux caractérisés (Berger and Moller 2002). La troglitazone (Rezulin®, Parke-Davis), la rosiglitazone (Avandia®, GalxoSmithKline) et la pioglitazone (Actos®, Eli Lilly) ont été successivement lancées sur

le marché afin de traiter la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. La troglitazone a cependant été retirée en 2000 suite à l'observation de plusieurs effets hépatotoxiques sévères (Van Gaal and Scheen 2002). Quoique le mécanisme d'action exact de ces ligands de PPAR γ dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline soit encore mal connu, le tissu adipeux est probablement sa principale cible.

3.4.2.1 Les modulateurs sélectifs de PPAR γ (SPPAR γ Ms)

L'apparition des agonistes partiels vient d'une approche dont la rationnelle est de développer des composés ayant une affinité suffisante envers PPAR γ permettant de préserver l'augmentation de la sensibilité à l'insuline sans toutefois saturer l'activité du récepteur, dans le but de diminuer les effets secondaires associés au TZDs. Ainsi sont nées les modulateurs sélectifs de PPAR γ (SPPAR γ Ms) regroupant, entre autres, le metaglidasen/halofenate (Allen et al. 2006), le Fmoc (fluoren-9-ylmethoxycarboxyl)-leucine (Burgermeister et al. 2006), le KR-62980 (Kim et al. 2006b) et le nTZDpa (agoniste partiel non-TZD) (Berger et al. 2003). Ces médicaments potentiels sont présentement à différents stades cliniques et précliniques (en revue dans (Zhang et al. 2006)) où ils semblent prouver leur utilité puisqu'ils exercent moins d'effets secondaires sur la prise de poids, l'adiposité et l'hypertrophie cardiaque tout en préservant leur effet bénéfique sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Il est intéressant de noter que les SPPAR γ Ms lient distinctement la poche de liaison de PPAR γ , induisant une conformation alternative du récepteur, un recrutement-relargage

différent de cofacteurs et un patron divergent d'expression des gènes cibles qui se résulte en des réponses cellulaires et biologiques distinctes.

3.4.2.2 Les antagonistes de PPAR γ

Le développement des antagonistes de PPAR γ exploite le paradoxe, encore inexpliqué, qu'une diminution de l'activité de PPAR γ améliore elle aussi la sensibilité à l'insuline. En effet, Miles et *coll.* ont démontré que les souris hétérozygotes déficientes en PPAR γ ont en partie une meilleure sensibilité à l'insuline que leurs semblables de types sauvages (Miles et al. 2000). Dans cette optique, quelques antagonistes ont été testés *in vivo* : le SR-202 (Rieusset et al. 2002) et le T2384 (Li et al. 2008). Tous deux semblent améliorer la sensibilité à l'insuline et prévenir le développement de l'obésité dans différents modèles de souris obèses et/ou diabétiques.

3.4.2.3 Effet synergique des ligands de PPAR γ et RXR

L'hétérodimère formé par PPAR γ et RXR est permissif, c'est-à-dire que les deux partenaires peuvent être activés indépendamment et de façon synergique par leurs agonistes respectifs (Cha et al. 1999; Mukherjee et al. 1997; Schulman et al. 1998). Toutefois, RXR est le partenaire de dimérisation d'une quinzaine de récepteurs nucléaires, incluant LXR, le récepteur de farnesoïde X, le récepteur de l'acide rétinoïque, le récepteur de la vitamine D et le récepteur Nurr-1 (Bugge et al. 1992; Forman et al. 1995a; Kliewer et al. 1992; Perlmann and Jansson 1995; Willy et al. 1995). Ce rôle unique permet à RXR d'influencer une multitude de mécanismes impliqués dans la régulation de la fonction métabolique et

endocrinienne. Récemment, l'administration d'un modulateur de RXR sélectif envers l'hétérodimère PPAR/RXR, le LG101506, a montré les mêmes effets bénéfiques sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline que les TZDs, avec l'avantage de prévenir la prise de masse grasse (Leibowitz et al. 2006). De ce fait, la double activation de l'hétérodimère permissif permet un niveau additionnel de régulation du métabolisme de l'insuline et des lipides.

3.5 Interaction avec les cofacteurs

Plusieurs cofacteurs sont impliqués dans la capacité de PPAR γ à initier ou à supprimer le processus de transcription. Leur principal mode d'action est de moduler l'acétylation des queues N-terminales des histones et de ce fait le degré de compaction de la chromatine. L'hyperacétylation et la méthylation des histones sur les nucléosomes situés au voisinage de site de liaison de PPAR γ :RXR produit une structure « ouverte » de la chromatine qui facilite l'accès des facteurs généraux de la transcription nécessaires à l'amorçage de la transcription (Figure 18, p.69). À l'inverse, la désacétylation et la déméthylation des queues des histones sur les nucléosomes environnant le PPRE répriment l'expression des gènes suite à la condensation de la chromatine.

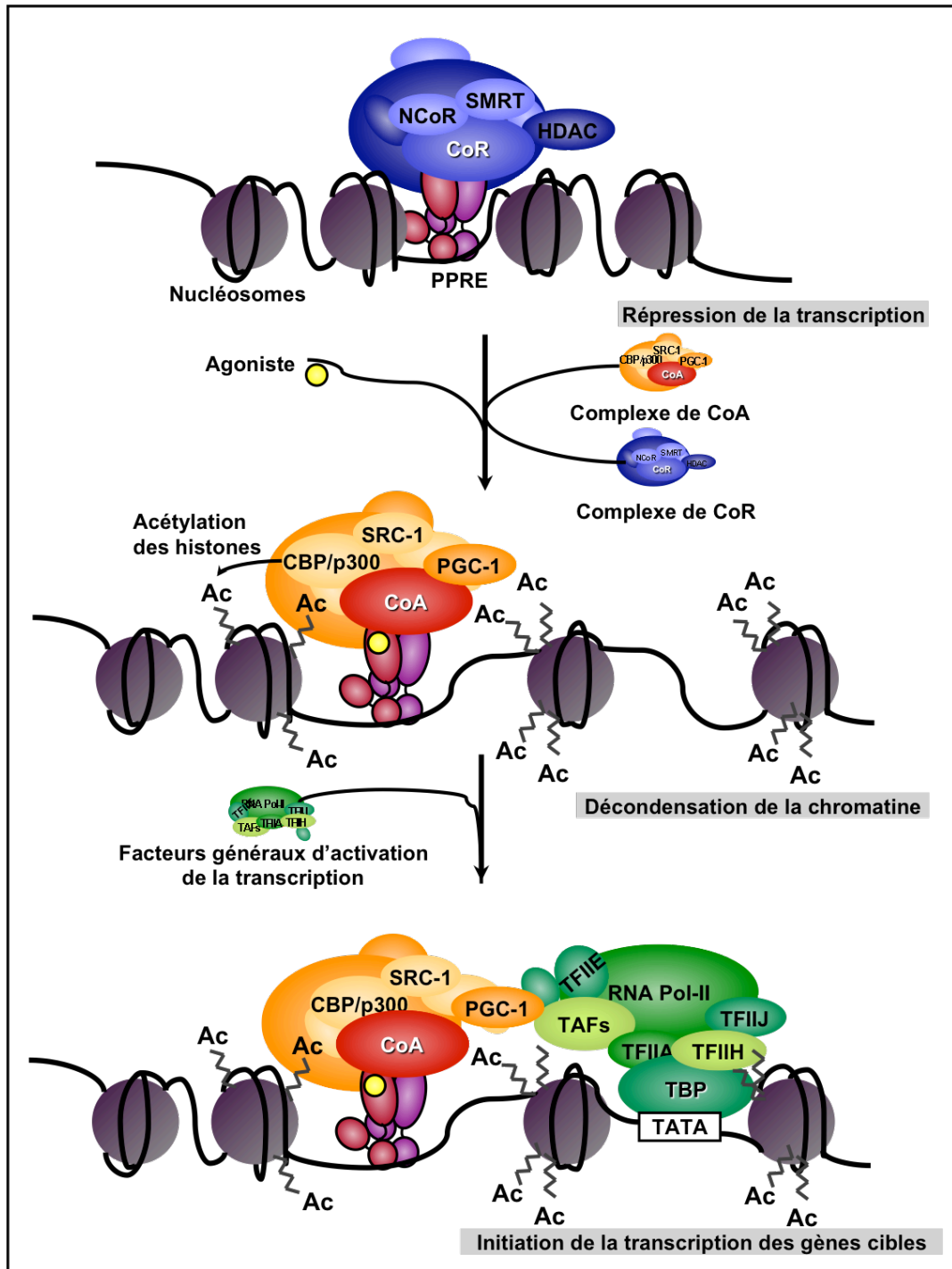


Figure 18 : Initiation de la transcription par PPAR γ

3.5.1 Les coactivateurs

L'interaction entre PPAR γ et les coactivateurs dépend de la nature du ligand lié au récepteur. Par exemple, la liaison du ligand naturel 15d-PGJ₂ sur PPAR γ initie le recrutement d'un complexe de coactivateurs différents de celui recruté lors de la liaison de l'agoniste synthétique Troglitazone. La dynamique du complexe PPAR γ -ligand-coA a ainsi un effet déterminant sur le niveau d'expression des différents gènes cibles.

Les coactivateurs remodelent la chromatine et repositionnent des nucléosomes via leurs fonctions acétyltransférase (HAT) et méthyltransférase (HMT). L'hyperacétylation des histones dans des nucléosomes proches du promoteur, déclenchée par la présence du complexe, induit la décondensation de la chromatine et facilitent la liaison du complexe préinitiateur sur la région promotrice des gènes activés. La nature des coAs varie selon le promoteur ciblé, mais ils contiennent tous plusieurs motifs LxxLL (L : leucine; x : acide aminé quelconque) permettant une liaison coopérative sur PPAR γ et RXR. Les principaux CoAs identifiés à ce jour sont indiqués dans le Tableau V, à la page suivante.

Tableau V : Les corégulateurs de PPAR γ

Coactivateur	Nom complet (noms alternatifs)	Activité enzymatique	Fonction
ARA70	Protéine associée au récepteur des androgènes 70	HAT	Acétylation des histones (Heinlein et al. 1999; Yeh and Chang 1996)
BAF60c	Sous-unité 2 du facteur de transcription de 60 kDa associé à BRG1/Brm	Aucune	Recrute le complexe de remodelage de la chromatine (Debril et al. 2004)
CBP/p300	Protéine de liaison CREB	HAT	Acétylation des histones Recrute les p160 (Bannister and Kouzarides 1996)
EDF-1	Facteur associé à la différenciation endothéliale	Aucune	Sert de pont avec la machinerie transcriptionnelle (Brendel et al. 2002; Leidi et al. 2009)
Famille des p160 SRC-1, -2, et -3	Coactivateur des récepteurs stéroïdiens -1 (RIP160), -2 (TIF2) et -3 (p/CIP)	HAT	Acétylation de la chromatine Relie le complexe de transcription et la machinerie transcriptionnelle (Chen et al. 1997; Spencer et al. 1997)
LMO4	Protéine 4 ayant seulement des domaines LIM	Aucune	Favorise l'interaction entre PPAR γ et RXR (Schock et al. 2008)
NCoA6	Coactivateur 6 des récepteurs nucléaires	Aucune	Recrute un complexe contenant des méthyltransférases (Lee et al. 1999; Yu and Reddy 2007)
PBP	Protéine de liaison de PPAR γ (TRAP220)	Aucune	Sert de pont avec la machinerie transcriptionnelle (Freedman 1999; Zhu et al. 1997)
PGC-1 α et β *	Coactivateur de PPAR γ -1 et -2	Aucune	Recrute les protéines HAT (Puigserver and Spiegelman 2003)
PRIC285	Cofacteur interagissant avec PPAR α	Hélicase	Remodelage de la chromatine (Kim et al. 2003; Ko et al. 2000)
PRIP	Protéine interagissant avec PPAR	Aucune	Sert de pont entre les complexes de cofacteurs ancrés à CBP et PBP (Qi et al. 2003; Zhu et al. 2000)
SHP	Petit partenaire d'hétérodimère	Aucune	Compétitionne avec les corépresseurs nucléaires (Nishizawa et al. 2002)
Tip60	Protéine 60 interagissant avec Tat du VIH	HAT	Acétylation des histones (van Beekum et al. 2008)
TRIP3	Protéine interagissant avec le récepteur de l'hormone thyroïdienne	Aucune	Non définie (Koppen et al. 2009)

*exprimés exclusivement dans les adipocytes, le muscle squelettique et le foie

3.5.2 Les corépresseurs

Les deux principaux corépresseurs de PPAR γ sont le répresseur du récepteur nucléaire, NCoR et le médiateur silencieux des rétinoïdes et de l'hormone thyroïdienne, SMRT (Chen and Evans 1995; Horlein et al. 1995). Leur présence recrute des histones désacétylases (HDACs) et influence les interactions avec la machinerie transcriptionnelle basale (Muscat et al. 1998). Les deux corépresseurs ont une action spécifique envers les promoteurs des différents gènes cibles de PPAR γ , puisqu'ils inhibent la transcription par PPAR γ /RXR sur certains gènes (ex. *glycérol kinase*) alors qu'ils sont absents du même complexe PPAR γ /RXR/ADN d'autres gènes cibles (ex. *aP2*). Ces derniers sont alors activés de façon constitutive par l'association de coA et ce malgré l'absence de ligand. Les corépresseurs engendreraient ainsi une permutation moléculaire inhibant spécifiquement l'expression de certains gènes cibles de PPAR γ (Guan et al. 2005; Takahashi et al. 2008).

Il existe par ailleurs des mécanismes de rétroinhibition pouvant limiter l'activation du récepteur en présence soutenue d'agoniste. Alors que SMRT et NCoR s'associent à PPAR γ en absence de ligand ou en présence d'antagoniste, la protéine 140 d'interaction du récepteur (RIP140) et la protéine du rétinoblastome (Rb) interagissent plutôt avec PPAR γ en présence d'agoniste et atténuent de ce fait l'expression de ses gènes cibles (Fajas et al. 2002; Treuter et al. 1998; Yu et al. 2005).

3.6 Régulation par des modifications post-traductionnelles

La régulation de PPAR γ par des mécanismes indépendants de la liaison du ligand permet au récepteur d'intégrer des signaux provenant de la membrane plasmique. L'activité transcriptionnelle de PPAR γ est modulée par différentes modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation. La modification directe de PPAR γ , mais aussi la modification de ses partenaires d'interaction va influencer l'expression des gènes cibles (Lai et al. 2008; Leff 2003; Puigserver et al. 2001; Rowan et al. 2000; Sano et al. 2007). Dans le cadre de ce travail, nous nous limiterons aux modifications directes sur PPAR γ .

3.6.1 La phosphorylation

Le domaine AF-1 de PPAR γ régule la spécificité de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ lors de l'adipogenèse (Hummasti and Tontonoz 2006). La phosphorylation de la région AF-1 de PPAR γ 2 sur la sérine 112 par les MAPKs (Figure 15, p.61) provoque un changement de conformation du récepteur qui se répercute, sur le LBD, en une réduction l'affinité du récepteur pour ses ligands et par conséquent diminue son activité transcriptionnelle (Shao et al. 1998) . Plusieurs facteurs de croissance, par l'activation de la voie des MAPKs, inhibent ainsi l'activité transcriptionnelle de PPAR γ (Figure 19, p.75) :

- Le traitement des adipocytes avec le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) diminue l'activité de PPAR γ (Camp and Tafuri 1997).

- Le TGF- β 1 diminue l'expression de CD36 induite par le troglitazone dans les macrophages (Han et al. 2000b).
- L'insuline induit la phosphorylation de PPAR γ 2 via l'activation des MAPKs ERK qui répriment l'activité de PPAR γ (Adams et al. 1997; Hu et al. 1996)
- *In vitro*, JNK induit la phosphorylation PPAR γ de façon similaire (Camp et al. 1999).

À l'opposé, dans un modèle de fibroblastes murins, l'abolition du site de phosphorylation par la création du mutant S112A semble plutôt diminuer l'activité de PPAR γ (Compe et al. 2005). Dans ce modèle, la kinase 7 dépendante de la cycline (cdk7) est responsable de la phosphorylation de S112. Ces résultats suggèrent que l'influence de la phosphorylation de PPAR γ dépend de facteurs spécifiques à chacun des modèles étudiés. L'implication physiologique de la sérine 112 de PPAR γ a été étudiée de façon élégante par la génération de souris présentant la mutation PPAR γ 2S112A (Figure 19, p.75). Ces souris sont résistantes au développement de l'obésité induite par une diète riche en lipides et présentent des cellules adipeuses de plus petite taille. L'abolition de la phosphorylation de la sérine 112 produit une amélioration de la sensibilité à l'insuline due à une augmentation de la disposition du glucose dans le muscle. Ces réponses sont similaires à celles induites par le traitement des animaux avec la troglitazone (Rangwala et al. 2003).

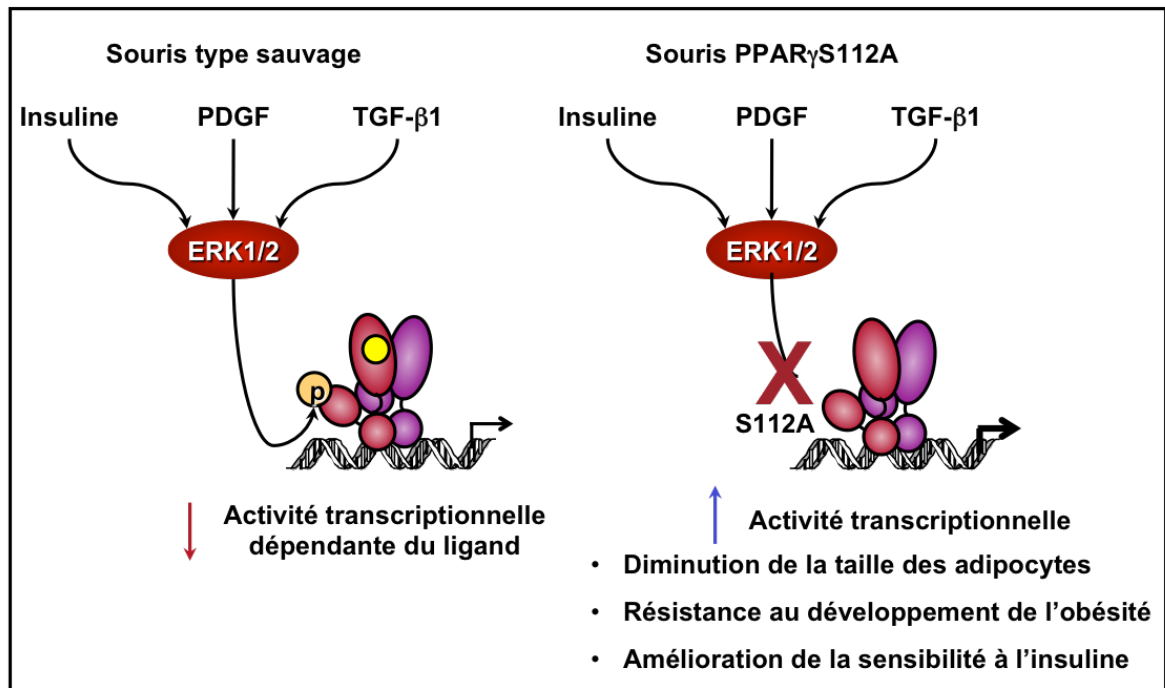


Figure 19 : La régulation de PPAR_γ par phosphorylation

3.6.2 L'ubiquitination

L'attachement covalent d'ubiquitines sur les lysines des protéines envoie un signal de dégradation par le protéasome 26S (Hershko and Ciechanover 1998). L'ubiquitination et la dégradation par le protéasome sont liées à l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires puisqu'elles régulent le niveau d'expression cellulaire du récepteur (Dennis and O'Malley 2005). PPAR_γ est ciblé sur son LBD par la dégradation ubiquitine-protéasome. La dégradation de PPAR_γ est augmentée par la liaison d'un ligand par un mécanisme qui requiert une structure intacte de l'AF-2 et également une conformation activée du récepteur puisque l'association du corépresseur RIP140 à PPAR_γ s'oppose à l'effet du ligand sur la

dégradation (Hauser et al. 2000; Kilroy et al. 2009; Tsao et al. 2005). L'inhibition du protéasome augmente l'activité de PPAR γ , suggérant une réduction de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ par la dégradation dépendante du système ubiquitine-protéasome (Floyd and Stephens 2004).

3.6.3 La sumoylation

La sumoylation est une modification post-traductionnelle aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (small ubiquitin-like modifiers) sur une lysine acceptrice de la protéine cible. La sumoylation régule plusieurs propriétés biochimiques des protéines ciblées comme le trafic intracellulaire, l'interaction protéique, l'interaction ADN-protéine et l'activité transcriptionnelle. PPAR γ est sumoylé sur les lysines 77 et 365 (107 et 395 chez PPAR γ 2) (Pascual et al. 2005). La sumoylation de la K77 se produit indépendamment de la présence du ligand et exerce un effet inhibiteur sur l'activité de PPAR γ (Ohshima et al. 2004; Yamashita et al. 2004). À l'opposé, la sumoylation sur la lysine 365 par l'intermédiaire de Pias1 et Ubc9, dépend de la liaison du ligand. La K365 sumoylée favorise le recrutement d'un complexe de corépresseur composé de NCoR, de la HDAC 3 et conduit à la transrépression du promoteur de *iNOS* par la stabilisation du complexe de corépresseur sur le promoteur (Pascual et al. 2005). Ce mécanisme est schématisé à la Figure 20 (p.77), où TBL1 : transducine β -like 1 et TBL1R : protéine liée à TBL1. Également, il semble y avoir une relation entre la phosphorylation et la sumoylation de PPAR γ , puisque la phosphorylation de la S112 stimule la sumoylation de la K77 (Yamashita et al. 2004).

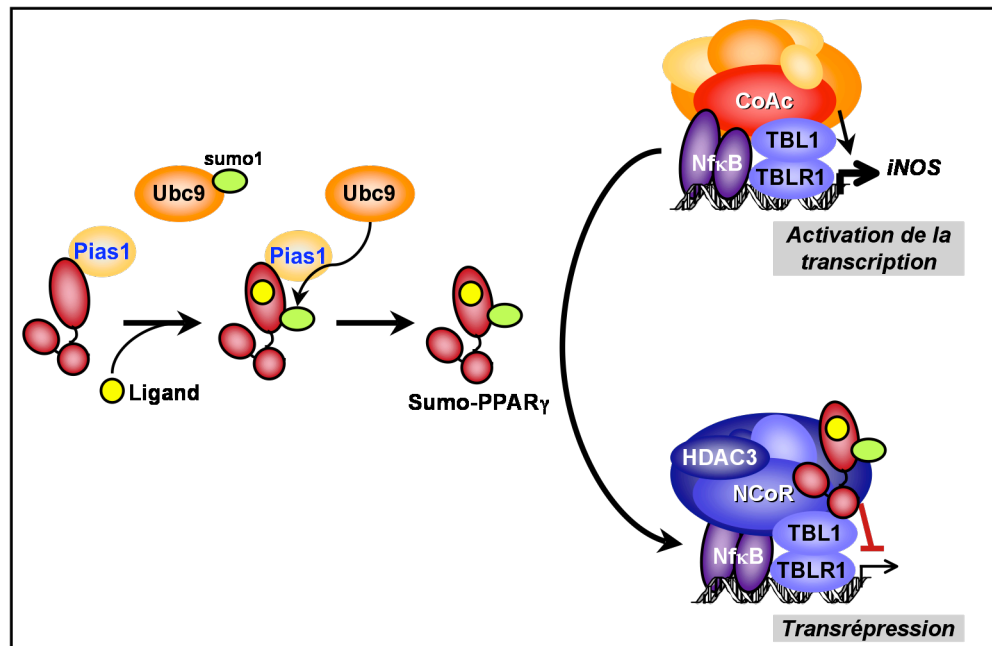


Figure 20 : Mécanisme de transrépression par PPAR γ sumoylé

3.6.4 La nitration

PPAR γ peut aussi subir la nitration par l'ajout d'un radical peroxynitrite (ONOO $^-$) sur un ou des résidus tyrosines. Dans les macrophages RAW264, la nitration séquestre PPAR γ dans le cytosol, ce qui diminue son activité transcriptionnelle en réponse au ligand 15d-PGJ $_2$ dans le noyau (Shibuya et al. 2002). La nitration pourrait donc réduire la capacité de PPAR γ à réguler les mécanismes inflammatoires.

3.6.5 Activité non-génomique de PPAR γ : rôle dans la régulation de l'inflammation

En plus de l'activation de la transcription, PPAR γ occupe un rôle important dans la régulation négative de l'expression des gènes par des mécanismes non-génomiques. Ce

phénomène est appelé la transrépression puisqu'il est indépendant de la liaison de PPAR γ /RXR sur un PPRE. Nous savons qu'un tel mécanisme se produit lors de la sumoylation de PPAR γ , mais il existe également d'autres mécanismes permettant à PPAR γ d'inhiber plusieurs gènes impliqués dans la réponse inflammatoire :

- PPAR γ peut lier directement le facteur de transcription NF κ B, un régulateur majeur de l'inflammation, et empêcher l'initiation de la transcription de son gène cible *interleukine-12 (Il-12)* (Chung et al. 2000; Ghosh and Hayden 2008).
- Un phénomène similaire est observé suite à l'activation par le 15d-PGJ₂ de PPAR γ qui favorise la séquestration du transducteur de signal et activateur de la transcription 3 (STAT3) avec PPAR γ , et inhibe la liaison de STAT3 à ses promoteurs cibles en réponse à l'interleukine-6 (IL-6) (Wang et al. 2004a).
- L'exposition d'entérocytes à une bactérie spécifique de l'intestin provoque la liaison de PPAR γ à la sous-unité p65/RelA de NF κ B et provoque la translocation du complexe du noyau vers le cytoplasme empêchant ainsi l'initiation de la transcription des gènes cibles de NF κ B avec diminution de la réponse inflammatoire (Kelly 2004).
- PPAR γ inhibe certains gènes par compétition pour les coactivateurs. Par exemple, l'activation de PPAR γ par un ligand réprime le promoteur de *cyclin D1* en favorisant l'interaction PPAR γ /p300 au détriment de AP-1/p300 (Li 2000).

3.7 Rôles de PPAR γ

3.7.1 PPAR γ , l'adipogenèse et le stockage des acides gras

L'adipogenèse réfère au processus de différenciation d'un précurseur pré-adipocytaire vers un adipocyte mature qui dépend d'une balance de signaux contradictoires minutieusement régulée par une programmation transcriptionnelle sous l'influence de différents signaux cellulaires. PPAR γ et les C/EBPs sont les facteurs de transcription qui gouvernent ce processus en adaptant l'expression d'un programme de gènes approprié en réponse à la disponibilité des acides gras. Tel qu'illustré à la Figure 21 (p.80), dans la phase initiale de l'adipogenèse, C/EBP β et δ activés en réponse à l'insuline et aux glucocorticoïdes (Wu et al. 1999) entraînent la transcription de PPAR γ en coopération avec la protéine 1 se liant à l'élément de réponse des stérols (SREBP1) (Kim and Spiegelman 1996). En phase terminale de l'adipogenèse, PPAR γ induit l'expression de C/EBP- α qui forme une boucle d'autorégulation positive et induit l'expression de PPAR γ . PPAR γ induit l'expression de marqueurs adipocytaires spécifiques comme la protéine de liaison des acides gras (aP2, aussi appelée FABP4), la carboxykinase phosphoenolpyruvate (PEPCK) et la lipoprotéine lipase (LPL) (Schoonjans et al. 1996; Tontonoz et al. 1995; Tontonoz et al. 1994a).

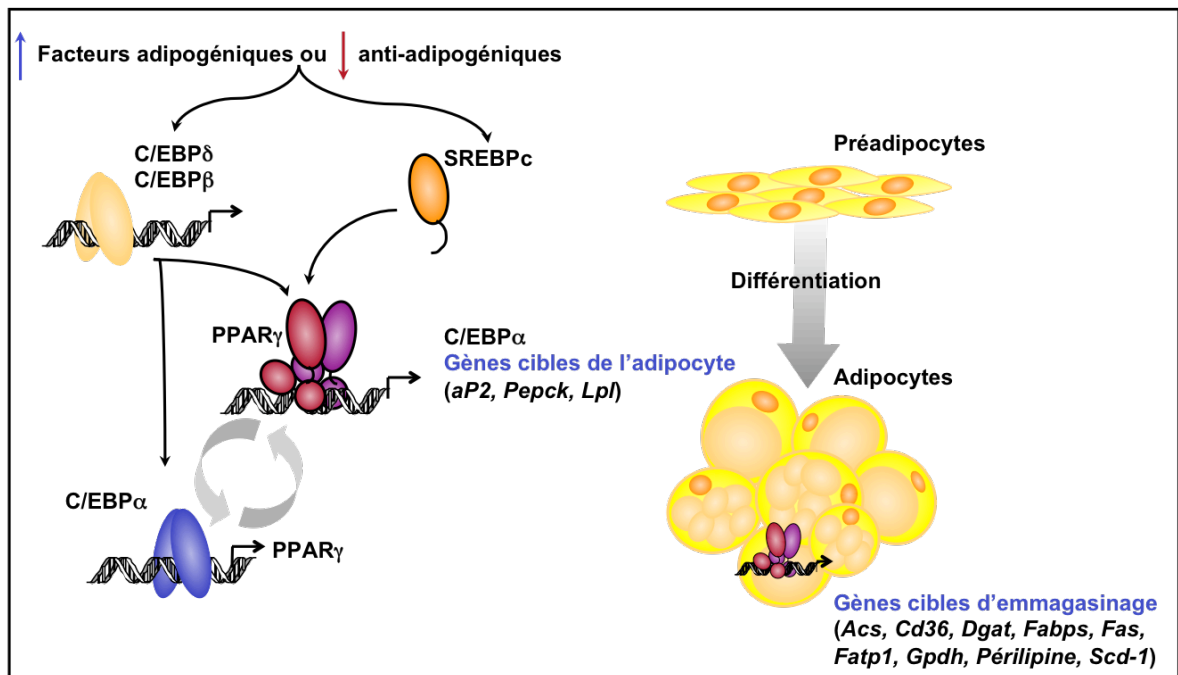


Figure 21 : PPAR γ et la fonction adipocytaire

Dans l'adipocyte mature, PPAR γ est également un régulateur majeur de l'accumulation des lipides dans le tissu adipeux blanc (Way et al. 2001). Il favorise le relâchement d'acides gras libres (AGL) des lipoprotéines circulantes en régulant l'expression de la lipoprotéine lipase (LPL) et stimule leur captation en augmentant l'expression du CD36 et de la protéine de transport des acides gras FATP1 (Martin et al. 2000; Schoonjans et al. 1996). De plus, PPAR γ régule la rétention et le transport intracellulaire des AGL en contrôlant l'expression des protéines liant les acides gras (FABPs) (Schachtrup et al. 2004). PPAR γ favorise l'estérification des AGL en triglycérides et leur stockage en régulant l'expression d'enzymes comme la carboxykinase, la déhydrogénase du glycérol-3-phosphate (GPDH) et la *O*-acyltransférase du diacylglycérol (DGAT) (Bogacka et al. 2004; Festuccia et al. 2009;

Olswang et al. 2002; Tontonoz et al. 1995). La périlipine, principale protéine associée avec les gouttelettes lipidiques de l'adipocyte jouant un rôle clé dans la régulation du stockage des lipides dans l'adipocyte et dans l'accumulation corporelle de masse grasse, est aussi activée par PPAR γ (Dalen et al. 2004; Greenberg et al. 1993). Finalement, PPAR γ participe à la synthèse *de novo* des AGL par la régulation directe ou indirecte de l'expression d'enzymes telle la synthase des acides gras (FAS), la synthase de l'acétyl-CoA (ACS) et la désaturase-1 du stéaroyl CoA (SCD-1) (Ranganathan et al. 2006; Riserus et al. 2005).

3.7.2 Rôle de PPAR γ et du CD36 dans le métabolisme lipidique du macrophage

PPAR γ est exprimé par les cellules circulantes et son expression est induite lors de la différenciation des monocytes en macrophages (Ricote et al. 1998). En tant que cellules effectrices du système immunitaire, les macrophages combinent des capacités de clairance des pathogènes avec une fonction modulatrice de l'immunité. La présence de dérivés d'acides gras comme les lipoprotéines de faible densité oxydées (LDLox) font partie de ce code de reconnaissance qui déclenche la phagocytose. Tel que décrit dans la section 2.3, l'absence de mécanismes de rétroaction négative limitant l'internalisation des lipides se résulte en une accumulation massive de cholestérol et crée l'apparence spumeuse des macrophages au niveau des lésions athérosclérotiques. PPAR γ et plusieurs de ses gènes cibles sont impliqués dans ce processus par leur implication fonctionnelle dans l'utilisation des lipides (Wellen and Hotamisligi 2003).

Initialement, l'internalisation et l'accumulation des lipides par la stimulation de la transcription du gène *Cd36* via PPAR γ (résumé à la section 2.4) dans le macrophage ont été suggérées favorables au développement des cellules spumeuses et potentiellement de l'athérosclérose (Nagy et al. 1998). Outrepassant ces inquiétudes, le traitement des souris avec les dérivés TZDs a eu plutôt des effets vasoprotecteurs et inhibiteurs du développement de l'athérosclérose (Li et al. 2000). L'étude rétrospective des études chez l'homme a également suggéré un effet athéroprotecteur des TZDs (Dormandy et al. 2005; Minamikawa et al. 1998). Le paradoxe de la dichotomie entre l'augmentation de l'internalisation des lipides par les macrophages et l'absence d'augmentation du risque de développement de l'athérosclérose a permis d'élucider l'activation d'une voie d'efflux des lipides, le transport inverse du cholestérol, qui empêche l'accumulation lipidique (Chawla et al. 2001; Chinetti et al. 1998).

3.7.2.1 Régulation de l'efflux de cholestérol du macrophage par PPAR γ

Dans les cellules périphériques, la régulation de l'homéostasie du cholestérol implique une communication entre PPAR γ et le récepteur X du foie α (LXR α). Tel qu'illustré à la Figure 22 (p.83), *Lxr alpha* qui est un gène cible de PPAR γ induit l'expression des transporteurs à cassette liant l'ATP (ABC). Les transporteurs ABCs, ABCA1 et ABCG1, stimulent le transport inverse du cholestérol non-estérifié (Ch) vers les particules de type apoA-I et les lipoprotéines de haute densité (HDL) matures respectivement (Chawla et al. 2001; Chinetti et al. 1998; Wang et al. 2006), responsables du transport du cholestérol vers le foie où il est transformé en acides biliaires afin d'être excrété. Certaines des composantes des LDLox

internalisées, particulièrement les 9- et 13-HODE, sont des ligands endogènes de PPAR γ . De plus l'expression de l'enzyme du cytochrome p450, Cyp27, qui catalyse la production de l'agoniste de LXR α , le 27-hydroxycholestérol, est accrue par PPAR γ , ce qui entraîne la formation de ligands pour LXR α (Szanto et al. 2004). L'activation de la cascade PPAR γ -LXR α -transporteurs ABC contribue ainsi grandement au métabolisme lipidique du macrophage et à la régulation du développement des cellules spumeuses.

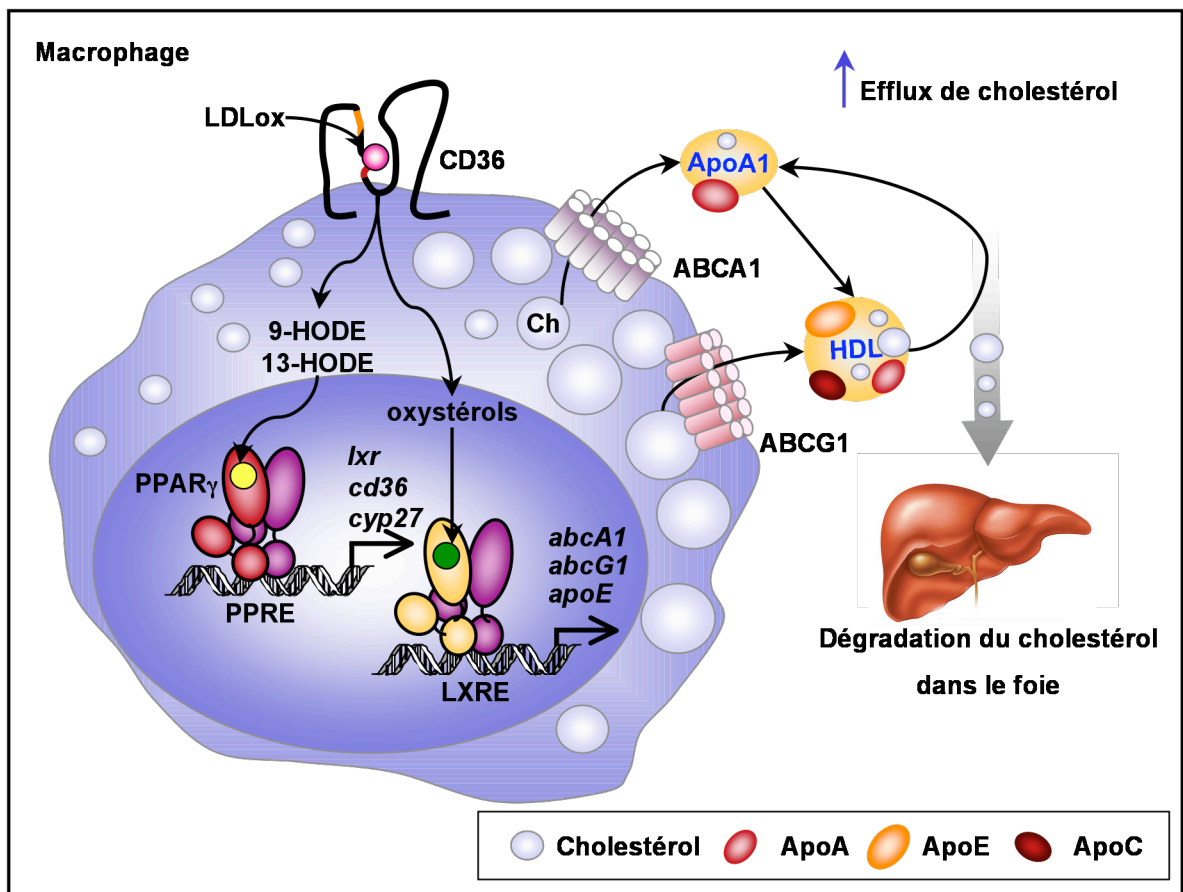


Figure 22 : La régulation de l'efflux de cholestérol par PPAR γ

La régulation positive de PPAR γ tient donc la promesse de nouvelles approches dans la prévention de l'athérosclérose, la première cause de morbidité et de mortalité reliées à l'âge dans les sociétés occidentales (Hennekens 1998).

3.7.3 Rôle de PPAR γ dans l'inflammation

De nombreuses études ont montré que l'administration de ligands de PPAR γ a une activité thérapeutique dans plusieurs modèles inflammatoires et de maladies autoimmunes comme l'arthrite rhumatoïde (Shiojiri et al. 2002), l'inflammation des voies respiratoires (Belvisi et al. 2006; Lee et al. 2006), l'encéphalomyélite autoimmune (Kielian and Drew 2003), la pancréatite (Ivashchenko et al. 2007), la pleurésie (Cuzzocrea et al. 2004) et l'inflammation des intestins (Dubuquoy et al. 2006). La plupart des effets anti-inflammatoires de PPAR γ résultent de l'intercommunication avec des mécanismes intracellulaires répresseurs qui ne sont pas génomiques (voir section 3.6.5). L'activation de PPAR γ diminue la production de cytokines inflammatoires comme le TNF- α , IL-6, IL-1 β , et l'oxide nitrique. Le ligand de PPAR γ GW7845 réprime aussi l'expression des gènes des chimiokines CXCL1, -9 et -10, CCL2, -4, -7, -12, -17 et-19 (Ogawa 2005). Certains des effets sur l'expression des chimiokines requièrent la présence de NCoR, par un mécanisme semblable à celui décrit à la Figure 20 (p.77). La réduction du recrutement des cellules inflammatoires est également un élément important de l'action anti-inflammatoire des ligands de PPAR γ (Acosta-Rodriguez et al. 2007; Michael et al. 2001).

3.7.4 PPAR γ et la sensibilité à l'insuline

Le diabète de type 2 est caractérisé par une résistance à l'action de l'insuline, qui se définit par l'incapacité de l'insuline à stimuler la disposition du glucose dans le muscle et le tissu adipeux et à réprimer la gluconéogenèse dans le foie. De plus, un des rôles centraux de PPAR γ est de promouvoir l'adipogenèse, l'adiposité étant associée à la résistance à l'insuline (Lehmann 1995; Nolan et al. 1994). Les conséquences métaboliques de la résistance à l'insuline sont des désordres majeurs dans l'homéostasie des lipides et du glucose dans le foie, le muscle et le tissu adipeux. Plusieurs études génétiques ont montré l'implication de PPAR γ dans l'homéostasie du glucose. Des rares mutations dominantes-négatives de PPAR γ chez l'homme causent une lipodystrophie partielle, une sévère résistance à l'insuline, le diabète et l'hypertension (Barroso et al. 1999). À l'opposé, la diminution de l'activité de PPAR γ par le polymorphisme Pro12Ala est associée avec un indice de masse corporelle bas et une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Altshuler et al. 2000; Deeb et al. 1998). De plus, les souris présentant la mutation S112A sur PPAR γ sont protégées de la résistance à l'insuline reliée à l'obésité (Rangwala et al. 2003). Les activités de PPAR γ et de l'insuline sont donc très intimement reliées puisqu'elles sont mutuellement régulées. D'un côté, l'insuline module l'activité transcriptionnelle de PPAR γ par l'intermédiaire de la phosphorylation par les MAPKs (section 3.6.1, p.73) et de l'autre côté, PPAR γ est un régulateur majeur de la sensibilité à l'insuline.

Tel que décrit à la section 3.4.2 (p.65), les dérivés TZDs sont présentement utilisés en clinique pour le traitement du diabète de type 2 puisqu'ils augmentent fortement la

sensibilité à l'insuline et potentialisent l'utilisation du glucose en périphérie. L'hypothèse la plus probable de cet effet bénéfique est que les TZDs, en activant PPAR γ dans le tissu adipeux, empêchent l'accumulation des lipides au niveau du muscle et du foie où l'accumulation de gras exerce des effets délétères. Des facteurs autres que la redistribution des lipides pourraient également être considérés. Parmi ceux-ci, on retrouve les adipokines, un groupe de protéines sécrétées par l'adipocyte qui sont régulatrices du métabolisme inter-organes (Maeda et al. 2001). L'activation de PPAR γ augmente la production de l'adiponectine, ce qui promouvoit le catabolisme des acides gras et améliore la sensibilité à l'insuline (Ferre 2004). D'autres médiateurs comme la leptine et la résistine pourraient également être impliqués. Un résumé des effets des TZDs dans les différents tissus est illustré à la Figure 23 (p.87).

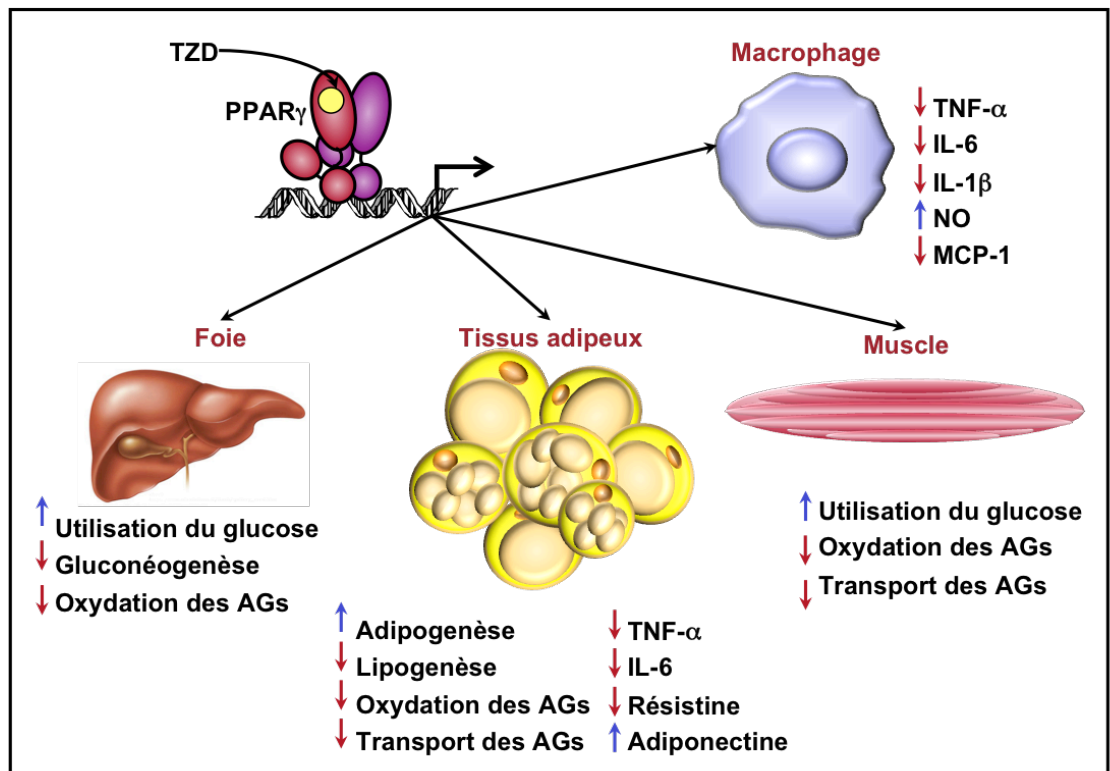


Figure 23 : Effets anti-diabétogènes des TZDs

3.7.5 Rôle novateur du macrophage dans la sensibilité à l'insuline

De nombreuses études récentes relient désormais le macrophage avec la résistance à l'insuline. Étonnamment, la déletion spécifique du gène *Pparγ* dans le macrophage (Mac-PPAR γ KO) régule l'obésité et la sensibilité à l'insuline, qui sont deux composantes importantes dans le développement de syndrome métabolique et du diabète de type 2. Plus spécifiquement, Odegaard et *coll.* ont montré qu'après 17 semaines sous une diète riche en lipides, les souris Mac-PPAR γ KO avaient accumulé environ 15 % plus de poids que les souris contrôles. L'augmentation de masse provenait principalement d'une augmentation de la masse grasse (20 % de plus) (Odegaard et al. 2007). L'hypothèse émise est que PPAR γ

est essentiel dans l'expression du phénotype activé des macrophages et que l'absence de macrophages activés dans le tissu adipeux protège des conséquences métaboliques de l'obésité. La colonisation du tissu adipeux par les macrophages est désormais considérée comme un nouvel élément pouvant lier l'obésité, l'inflammation et la résistance à l'insuline. L'activation de PPAR γ par les TZDs diminue l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux via la réduction de l'expression de MCP-1 (Neels and Olefsky 2006; Wellen and Hotamisligi 2003) et l'augmentation de l'apoptose des macrophages infiltrés dans le tissu adipeux (Bodles et al. 2006; Chinetti et al. 1998). Cet effet pourrait être impliqué dans l'amélioration de la réponse à l'insuline par les TZDs.

4 Problématique et objectifs des travaux

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse visaient à mettre en évidence la possibilité de moduler le métabolisme lipidique du macrophage en activant les récepteurs CD36 et GHS-R1a. Bien que l'implication du récepteur CD36 dans le développement de l'athérosclérose ait été clairement établie, l'impact de la liaison de ligands de la famille des GHRP au CD36 sur la progression des lésions athérosclérotiques n'avait jamais été étudié. De plus, malgré que plusieurs groupes de recherche aient mis en évidence l'implication importante du récepteur de la ghréline dans la régulation de nombreux processus physiologiques, très peu de données étaient disponibles dans la littérature pour préciser l'implication du GHS-R1a dans la modulation du métabolisme lipidique au niveau du macrophage. Il semblait donc primordial d'effectuer des analyses approfondies de l'impact de l'activation des récepteurs CD36 et GHS-R1a sur la régulation de l'homéostasie lipidique du macrophage. Par conséquent, les objectifs primaires de mes travaux de doctorat étaient de :

- I. Évaluer le potentiel anti-athérosclérotique du GHRP hexaréline (chapitre 5), plus spécifiquement :
 - a. Déterminer l'effet d'un traitement à l'hexaréline sur la régulation du processus athérosclérotique *in vivo* à moyen terme.
 - b. Évaluer la capacité de l'hexaréline à moduler le métabolisme lipidique du macrophage.

- c. Établir les mécanismes impliqués dans le contrôle du métabolisme lipidique du macrophage par l'hexaréline.

II. Comprendre les mécanismes de signalisation du récepteur de la ghréline impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ (chapitre 6), plus spécifiquement :

- a. Confirmer l'implication du GHS-R1a dans la modulation du métabolisme lipidique du macrophage.
- b. Effectuer une étude approfondie de la signalisation résultant de la liaison de la ghréline sur le GHS-R1a dans le macrophage.
- c. Étudier l'implication de la phosphorylation de la sérine 84 et de la région AF-1 de PPAR γ dans la régulation de son activité transcriptionnelle suite à l'activation du GHS-R1a.

Chapitre 5 et 6 : Résultats

Publications à titre de premier auteur

A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor up-regulates sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. Avallone R*, **Demers A***, Rodrigue-Way A, Bujold K, Harb D, Anghel S, Wahli W, Marleau S, Ong H, Tremblay A. **Mol Endocrinol.** 2006 Dec;**20(12):3165-78.** *R.A. and A.D. contributed equally to this work

A concerted kinase interplay identifies PPARgamma as a molecular target of ghrelin signaling in macrophages. **Demers A**, Caron V, Rodrigue-Way A, Wahli W, Ong H, Tremblay A. **PLoS One** 2009 Nov 4;**4(11)e7728.**

Hexarelin Signaling to PPARgamma in Metabolic Diseases. **Demers A**, Rodrigue-Way A, Tremblay A. **PPAR Res.** 2008;**2008:364784.** Review

Publications à titre de coauteur

A growth hormone-releasing peptide promotes mitochondrial biogenesis and a fat burning-like phenotype through scavenger receptor CD36 in white adipocytes. Rodrigue-Way A, **Demers A**, Ong H, Tremblay A. **Endocrinology.** 2007 Mar;**148(3):1009-18.**

EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. Marleau S, Harb D, Bujold K, Avallone R,

Iken K, Wang Y, **Demers A**, Sirois MG, Febbraio M, Silverstein RL, Tremblay A, Ong H.
FASEB J. 2005 Nov;19(13):1869-71.

Chapitre 5 : L'hexaréline et le macrophage

A Growth Hormone-Releasing Peptide that Binds Scavenger Receptor CD36 and Ghrelin Receptor Upregulates ABC Sterol Transporters and Cholesterol Efflux in Macrophages Through a PPAR γ -dependent Pathway

**Roberta Avallone,^{1,2,3,*} Annie Demers,^{1,2,*} Amélie Rodrigue-Way,^{2,5}
Kim Bujold,¹ Diala Harb,¹ Silvia Anghel,⁴ Walter Wahli,⁴ Sylvie Marleau,¹ Huy Ong,¹
and André Tremblay^{2,5,6}**

¹Faculty of Pharmacy, Pavillon Jean-Coutu, University of Montreal, Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada

²Research Center, Ste-Justine Hospital, Montreal, Québec, H3T 1C5 Canada

⁴Center for Integrative Genomics and NCCR Frontiers in Genetics, University of Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

⁵Departments of Biochemistry, and ⁶Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montréal, Québec, H3T 1C5 Canada

Key words: atherosclerosis; macrophages; nuclear receptors; PPAR; LXR; ABCA1; ABCG1; CD36; GHS-R1a; GHRP; hexarelin; ghrelin; ApoE-knockout mice; oxidized LDL

Short title: Activation of PPAR γ by hexarelin

Address all correspondence and requests for reprints to: André Tremblay, Research Center, Ste-Justine Hospital, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), Canada, H3T 1C5; or Huy Ong, Pavillon Jean-Coutu, University of Montreal, Montréal (Québec), Canada, H3C 3J7.

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to disclose.

³Present address: Ricerca Farmacologica, Sanofi Midy Research Center, Sanofi-Synthelabo S.p.A., via Piranesi 38, 20137 Milano, Italy.

* These authors have contributed equally to this work

Avant-Propos

Le développement des GHSs avait pour but de trouver une thérapie alternative de remplacement de l'hormone de croissance. L'administration de ces sécrétines est avantageuse puisqu'elle stimule la sécrétion endogène de l'hormone de croissance via le GHS-R1a hypophysaire. Des effets cardioprotecteurs de l'hexaréline ont rapidement été rapportés, et en 2002, nous avons identifié le récepteur CD36 comme cible de l'hexaréline au niveau cardiaque (Bodart et al. 2002). Le CD36 était alors déjà connu pour la liaison et l'internalisation des LDLox par les monocytes/macrophages (Nicholson et al. 1995) et son rôle majeur dans le développement de l'athérosclérose a été démontré par l'équipe du Dr Silverstein lors d'expériences avec des animaux déficients en CD36 qui présentent une diminution de plus de 75 % de lésions athérosclérotiques dans le tronc aortique (Febbraio et al. 2000). La délétion du CD36 est alors suggérée comme traitement protecteur de l'athérosclérose. Nous avons alors entrepris d'identifier le site de liaison de l'hexaréline sur le récepteur CD36 et conclu que le domaine de liaison du peptide chevauche celui des LDLox (Demers et al. 2004). L'ensemble de ces observations semble donc suggérer que l'interaction de l'hexaréline et du récepteur CD36 constitue un terrain d'étude adéquat pour étudier les effets fonctionnels des GHRPs sur la prévention du développement des lésions athérosclérotiques. Notre étude s'est intéressée à l'effet de l'hexaréline sur le développement de l'athérosclérose par l'utilisation d'un modèle de souris délétées en ApoE prédisposées au développement de lésions athérosclérotiques et à décortiquer les mécanismes moléculaires à l'origine des effets bénéfiques que nous avons observés. Les données

expérimentales obtenues positionnent le CD36, et également le récepteur GHS-R1a, au sein d'un mécanisme moléculaire dépendant du récepteur nucléaire PPAR γ régulant l'efflux de cholestérol du macrophage par l'initiation de la cascade PPAR γ -LXR α -transporteurs ABC.

Contribution de chacun des auteurs de la publication no 1 :

- | | |
|---------|--|
| R.A. | Conceptualisation du projet, expériences, analyse des résultats |
| A.D. | Stratégie expérimentale, expériences, analyse des résultats |
| A.R.-W. | Discussion, écriture de l'article |
| K.B. | Expériences d'efflux et analyse des résultats (fig. 1D et 6E) |
| D.H. | Analyse de coupes tissulaires (fig. 6F et G) |
| S.A. | Aide technique pour expériences avec les animaux PPAR γ hétérozygotes |
| W.W. | Infrastructure pour les expériences avec les animaux PPAR γ hétérozygotes |
| S.M. | Discussion |
| H.O. | Initiation et conceptualisation du projet |
| A.T. | Conceptualisation du projet et écriture de l'article |

Résumé

Les macrophages jouent un rôle central dans le développement de l'athérosclérose en favorisant la captation de lipoprotéines oxydées dans l'espace sub-endothélial des artères via les récepteurs scavengers, dont le CD36. Nous démontrons ici la capacité du GHRP hexaréline à augmenter l'expression des transporteurs de type ABC (ABCA1 et ABCG1), ainsi que l'efflux de cholestérol dans les macrophages. En ce sens, nous avons mesuré une augmentation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ en réponse à l'hexaréline dans un processus dépendant des récepteurs CD36 et GHS-R1a, aussi appelé le récepteur de la ghréline. La présence du domaine de liaison au ligand (LBD) de PPAR γ n'est pas essentielle à l'activation de PPAR γ par l'hexaréline. De plus, le traitement des macrophages THP-1 par l'hexaréline induit une augmentation de l'état de phosphorylation de PPAR γ , ce qui suggère que l'activation de PPAR γ implique le domaine d'activation AF-1 de PPAR γ . Finalement, l'injection d'hexaréline *in vivo* chez des souris déficientes en ApoE soumises à une diète riche en cholestérol et en lipides, une condition prédisposant au développement de l'athérosclérose, permet une réduction de la formation des lésions athéroscléreuses, en corrélation avec une augmentation de l'expression des gènes cibles de PPAR γ et LXR α dans les macrophages péritonéaux. Ces effets sont fortement diminués dans les macrophages de souris PPAR γ +/-, ce qui indique l'importance de PPAR γ dans la réponse à l'hexaréline. Les résultats obtenus exposent une nouvelle voie régulatrice de la cascade PPAR γ -LXR α -ABC induite par l'hexaréline via les récepteurs CD36 et GHS-R1a

permettant une mobilisation de l'excès de cholestérol en faveur du transport inverse vers les accepteurs de type HDL ayant le potentiel d'influencer l'évolution de l'athérosclérose.

Summary

Macrophages play a central role in the pathogenesis of atherosclerosis by accumulating cholesterol through increased uptake of oxidized LDL by scavenger receptor CD36 leading to foam cell formation. Here we demonstrate the ability of hexarelin, a growth hormone releasing peptide, to enhance the expression of ABCA1 and ABCG1 transporters and cholesterol efflux in macrophages. These effects were associated with a transcriptional activation of nuclear receptor PPAR γ in response to binding of hexarelin to CD36 and GHS-R1a, the receptor for ghrelin. The hormone binding domain was not required to mediate PPAR γ activation by hexarelin, and phosphorylation of PPAR γ was increased in THP-1 macrophages treated with hexarelin, suggesting that the response to hexarelin may involve PPAR γ AF-1 activity. However, the activation of PPAR γ by hexarelin did not lead to an increase in CD36 expression, as opposed to LXR α , suggesting a differential regulation of PPAR γ -targeted genes in response to hexarelin. Chromatin immunoprecipitation assays showed that, in contrast to a PPAR γ agonist, the occupancy of the CD36 promoter by PPAR γ was not increased in THP-1 macrophages treated with hexarelin, while the LXR α promoter was strongly occupied by PPAR γ in the same conditions. Treatment of apoE-null mice maintained on a lipid-rich diet with hexarelin resulted in a significant reduction in atherosclerotic lesions, concomitant with an enhanced expression of PPAR γ and LXR α target genes in peritoneal macrophages. Such response

was strongly impaired in PPAR γ ^{+/-} macrophages, indicating that PPAR γ was required to mediate the effect of hexarelin. These findings provide a novel mechanism by which the beneficial regulation of PPAR γ and cholesterol metabolism in macrophages could be regulated by CD36 and ghrelin receptor downstream effects.

Introduction

Macrophages play a key role in the early events of atherogenesis by accumulating cholesteryl ester and oxidized derivatives through increased uptake of oxidized LDL (oxLDL) by scavenger receptors such as CD36, thereby contributing to excessive lipid loading and atherogenic formation of foam cells. In addition to initiating a proinflammatory response in monocytes/macrophages, such internalization of oxLDL by CD36 provides a source of oxidized fatty acids and oxysterols that serve as endogenous ligands for the respective activation of the nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) and liver X receptor (LXR) (1,2).

The identification of several natural ligands, such as prostanoid derivatives and polyunsaturated and oxidized forms of fatty acids, have depicted all three isoforms of PPARs as important metabolic fatty acid sensors (3). Of these, PPAR γ is highly expressed in macrophages, and studies using synthetic PPAR γ ligands of the thiazolidinedione family have provided a role for PPAR γ to exert anti-atherogenic effects in animal models of atherosclerosis (4-6). PPAR γ was shown to increase in a positive feedback fashion the expression of scavenger receptor CD36, an effect strongly associated with excessive lipid accumulation and macrophage foam cell formation (7,8). However, PPAR γ activation also produces opposite effects by promoting the expression of LXR α which, upon activation by endogenous ligands such as oxysterols, induces the expression of genes involved in peripheral cholesterol efflux and transport from macrophages, such as apoE and ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1 (1,2,9,10). The metabolic cascade

involving PPAR γ and LXR α is therefore proposed as an attempt by the macrophage to enhance its ability to remove oxLDL from the vessel wall and shunt free cholesterol into the reverse cholesterol transport pathway, thus providing a protective effect against plaque formation in vivo. Hence, interfering with the balance between macrophage lipid uptake and efflux would be predicted to influence atherosclerotic lesion formation.

The growth hormone-releasing peptides (GHRPs) belong to a class of small synthetic peptides known to stimulate growth hormone release through binding to the GH secretagogue-receptor 1a (GHS-R1a), a G-protein coupled receptor originally identified in hypothalamus and pituitary (11). The endogenous ligand of GHS-R1a was later recognized as ghrelin, a 28-amino acid peptide primarily expressed in the mucosal layer of the stomach but also in several other tissues (12). The peripheral distribution of GHS-R1a in tissues such as heart, adrenals, fat, prostate and bone, has supported physiological roles of ghrelin and GHRPs not exclusively linked to GH release. For example, GH-independent effects on orexigenic properties, fat metabolism, bone cell differentiation, and hemodynamic control have been reported for ghrelin and GHRPs (13,14). Also, in conditions in which GH release was not promoted or in GH-deficient animals, the GHRP hexarelin was shown to feature cardioprotective effects by preventing ventricular dysfunction (15,16), and by protecting the heart from damages induced by post-ischemic reperfusion (17). Our recent findings demonstrating that hexarelin serves as a ligand for CD36 receptor in myocardium (18), and that it interferes with the binding of oxLDL by sharing the same interaction site on CD36

(19), have prompted us to evaluate the ability of hexarelin to modulate macrophage cholesterol metabolism.

Here, we demonstrate that hexarelin promotes cholesterol efflux from macrophages through the enhanced expression of LXR α and ABC transporters, an effect severely impaired in treated peritoneal macrophages isolated from PPAR γ heterozygote mice, implying an essential role for PPAR γ in mediating the response to hexarelin. The interaction of hexarelin with GHS-R1a, and to a lesser extent with CD36, resulted in transcriptional activation of PPAR γ , an effect also observed with ghrelin, the endogenous ligand of GHS-R1a. Using apoE-null mice, we show that the beneficial effect of hexarelin on macrophage cholesterol metabolism also occurred in vivo with a significant reduction in atherosclerotic lesions in treated mice. These findings therefore support a regulatory pathway by which CD36 and GHS-R1a mediated effects may translate into anti-atherosclerotic properties.

Results

Hexarelin reduces lipid accumulation and increases cholesterol efflux in human THP-1 macrophages

Human monocytic THP-1 cells were differentiated into adherent macrophage-like cells by the addition of phorbol myristate acetate (PMA) and tested for CD36 and GHS-R1a mRNA and protein expression (Fig. 1A). To determine whether hexarelin could modulate the scavenging function of CD36 to internalize oxLDL into macrophages, THP-1 cells were incubated with oxLDL to promote lipid accumulation and then treated with hexarelin. As determined by staining neutral lipids with Oil red O, the increase in size and number of lipid vesicles upon oxLDL loading was markedly diminished by treating cells with hexarelin (Fig. 1B). Hexarelin reduced the lipid loading in a significant and dose-dependent manner with a respective 23% and 40% decrease at 10^{-7} and 10^{-5} M hexarelin (Fig. 1C), suggesting that hexarelin prevents lipid accumulation from oxLDL uptake in THP-1 cells. Loading macrophages with oxLDL is known to provide the necessary ligands that promote PPAR γ activation and cholesterol removal (8,9). In order to test whether hexarelin by itself could promote cholesterol removal from macrophages, THP-1 cells were labeled with tritiated cholesterol and efflux of cholesterol was monitored in absence of oxLDL. As shown in Fig. 1D, treatment of THP-1 cells with 10^{-7} M hexarelin resulted in a significant 30% increase in cholesterol efflux to extracellular HDL acceptors, compared to untreated cells.

Hexarelin increases the metabolic PPAR γ -LXR α -ABC pathway in THP-1 macrophages

To evaluate the cellular mechanism by which cholesterol is removed from macrophages treated with hexarelin, we measured the expression of components of the PPAR-LXR-ABC pathway described to be involved in cholesterol efflux (9). While differentiating THP-1 into macrophage-like cells with PMA contributed to increase the expression of PPAR γ and LXR α , higher mRNA levels were consistently measured for PPAR γ and LXR α following treatment of THP-1 cells with hexarelin, reaching respectively a 5.4- and 3.3-fold increases at 48 hr treatment period, which correspond to 2.5- and 1.9-fold increases when normalized to untreated differentiated cells (Fig. 2A and B). Consistent with these changes, we also measured a 1.9- and a 3.2-fold increase in expression levels of respectively ABCA1 and ABCG1 in differentiated cells. These results indicate that hexarelin can induce the expression of components of the PPAR γ -LXR α -ABC pathway in THP-1 macrophages. Similarly, the expression of apoE, also described as an LXR target (10) with ABCA1 and ABCG1, was significantly increased under the same conditions. To ascertain whether these effects correlated with increases in protein levels, we observed by Western analysis a marked increase in PPAR γ , LXR α and transporters ABCA1 and ABCG1 protein levels upon treatment of cells for 24 and 48hrs with hexarelin (Fig. 2C). Consistent with our data on cholesterol efflux, these results indicate that THP-1 macrophages respond to hexarelin by increasing the expression of key markers involved in cholesterol removal.

Hexarelin signals to promote PPAR γ transcriptional activity

In order to determine whether the upregulation of PPAR γ and LXR α downstream targets in response to hexarelin was dependent upon PPAR γ activity in macrophages, we tested the effect of the highly selective PPAR γ inhibitor GW9662. We found that the increases in protein levels of PPAR γ , LXR α and ABCG1 in THP-1 cells treated with 10^{-7} M hexarelin were completely abrogated in the presence of increasing doses of GW9662 (Fig. 3A). ABCA1 protein levels were also diminished but not to basal levels, suggesting a residual regulation by possibly other PPAR isoforms, as opposed to ABCG1 which was found to be more dependent on PPAR γ (20). Our data therefore suggest that the transcriptional activation of PPAR γ is necessary to mediate the effects of hexarelin. To further elucidate whether hexarelin could signal to activate PPAR γ in macrophages, we used a cell reporter luciferase assay to directly assess PPAR γ activity. Murine RAW264.7 macrophages, which express both CD36 and GHS-R1a receptors (data not shown), were transfected with a Gal4-PPAR γ expression plasmid in the presence of a UAS γ Luc reporter containing the luciferase gene under the control of a Gal4 response element. As a control, treatment of transfected cells with the PPAR γ -selective ligand troglitazone resulted in a 2.1-fold increase in PPAR γ activity, while similar activation levels were also observed upon treatment with 10^{-7} M and 10^{-5} M hexarelin, suggesting that hexarelin could promote PPAR γ activity in macrophages (Fig. 3B). Since hexarelin has the potential to act through CD36 and/or GHS-R1a, we evaluated the ability of hexarelin to activate PPAR γ through each receptor using human 293 cells, which do not express either receptor. We found that while transfection of 293 cells with either CD36 or GHS-R1a expression plasmid did not result in

activation of PPAR γ , addition of 10^{-7} M hexarelin contributed to increase PPAR γ activity (Fig. 3C), suggesting that both receptors needed to be activated to signal to PPAR γ . In addition, these effects were shown to be additive as expression of CD36 and GHS-R1a together conferred a stronger activation of PPAR γ . Similarly, the potential of CD36 and GHS-R1a to translate the effects of hexarelin on PPAR γ activity was also monitored using a PPREtkLuc reporter in cells transiently expressing PPAR γ and RXR α . As shown in Fig. 3D, treating transfected 293 cells with increasing doses of hexarelin enhanced PPAR γ activity in the presence of either CD36 or GHS-R1a, suggesting that expression of either receptor was necessary to mediate the activation of PPAR γ by hexarelin. Given such agonist-independent activation of PPAR γ , we also tested the response of the other PPAR isoforms to hexarelin signaling. Similar to what we observed for PPAR γ , both PPAR α and PPAR β/δ were activated in cells expressing GHS-R1a and treated with hexarelin (Fig. 3E). However, using the same conditions, no significant activation of LXR α or LXR β was observed in response to hexarelin. These data suggest that activation of GHS-R1a by hexarelin results in the selective activation of PPAR isoforms, without directly modulating LXR activity.

The activation of PPAR γ through GHS-R1a activation is AF-1 dependent

The transcriptional ability of most nuclear receptors to regulate gene expression is dependent upon their AF-1 and AF-2 domain activity. While AF-2 activity is triggered by ligand binding to promote coregulator recruitment, it is also recognized that receptor AF-1 activity can mediate transcriptional activation in response to intracellular signaling

transduction pathways. Our results on the activation of PPAR γ by hexarelin through the GHS-R1a receptor suggest that PPAR γ activity might be under the control of such intracellular signaling by GHS-R1a. To determine whether AF-1 activity is involved in the PPAR γ response to GHS-R1a activation, we generated a Gal4-ABCD γ (aa1-254) truncated version of hPPAR γ , in which the entire ligand binding domain was deleted. As shown in Fig. 4A, using 293 cells transfected with GHS-R1a, hexarelin contributed to increase the Gal4-ABCD γ activity to a similar extent as for the full-length PPAR γ . The activation levels of the ABCD γ construct in response to hexarelin were dose-dependent in GHS-R1a expressing cells (Fig. 4B). These data therefore suggest a role of AF-1 in the regulation of PPAR γ activity through GHS-R1a activation by hexarelin.

Hexarelin promotes phosphorylation of PPAR γ in THP-1 macrophages

Post-translational modification such as phosphorylation is well known to regulate the AF-1 activity of many nuclear receptors, including PPAR γ (21). Given our results on the effects of hexarelin to regulate the AF-1 activity of PPAR γ , we next determined whether hexarelin could modulate the phosphorylation of PPAR γ . Using differentiated THP-1 macrophages, we found an increase in serine phosphorylation of PPAR γ in response to hexarelin treatment, as determined by immunoprecipitation of endogenous PPAR γ and Western analysis using an anti-phosphoserine antibody (Fig.4C). Such enhanced PPAR γ phosphorylation was readily observed after 5 min of treatment with hexarelin and in a dose-dependent manner, as compared to untreated cells, indicating that hexarelin may induce kinase activation within that period.

Hexarelin differently affects the expression and promoter occupancy of CD36 and LXR α genes by PPAR γ in THP-1 cells

Given the potential role of GHS-R1a and CD36 receptors to transduce the effect of hexarelin in macrophages, we wished to determine whether their expression was modulated under these conditions. The mRNA and protein levels of GHS-R1a were not significantly modified in differentiated THP-1 cells treated with hexarelin (Fig. 5A and B), indicating that GHS-R1a expression was apparently not under the regulation of PPAR γ . In the same conditions, CD36 expression was also not affected by hexarelin, with a slight decrease in mRNA levels and no change in its protein steady-state levels. The expression of SR-A, another scavenger receptor that mediates internalization of modified LDL, also remained unaffected, suggesting that macrophages treated with hexarelin may not result in enhanced lipid uptake through CD36 and SR-A scavenger receptors. The apparent downregulation in CD36 mRNA levels was rather surprising since CD36 has been described to be upregulated by ligands of PPAR γ in macrophages (7,8). In order to further investigate the mechanism by which this unexpected regulation of CD36 by hexarelin may result, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay to assess the relative occupancy by PPAR γ onto the promoter region of the CD36 gene, in comparison with LXR α which, in contrast to CD36, was upregulated in THP-1 cells treated with hexarelin (Fig. 2A and B). The CD36 and LXR α promoters were described to contain each a functional PPRE that mediates their enhanced expression by PPAR γ ligands (7,22). Following treatment of THP-1 cells, chromatin was immunoprecipitated using an anti-PPAR γ antibody, and the relative amount

of the CD36 and LXR α promoter region that contains the PPRE was assessed by PCR using specific primers, as depicted in Fig. 5C. As predicted, both CD36 and LXR α promoters were found to be occupied by PPAR γ in a greater extent in response to the PPAR γ agonist troglitazone. We also obtained a similar rise in the occupancy of LXR α promoter in cells treated with hexarelin, indicating that LXR α upregulation by hexarelin may result from a preferred recruitment of PPAR γ to the LXR α promoter. However, the occupancy of the promoter region of CD36 by PPAR γ was slightly diminished in response to hexarelin (Fig. 5C), consistent with the changes in CD36 mRNA expression. These findings suggest a selective mechanism used to differently regulate PPAR γ -targeted genes in response to hexarelin.

In vivo activation of the PPAR γ -LXR α -ABC pathway in peritoneal macrophages from mice treated with hexarelin

Concurrent with our findings that hexarelin can promote activation of the PPAR-LXR-ABC cascade in cultured THP-1 macrophages, we next addressed the question as to whether hexarelin might promote similar effects in vivo using ApoE-null mice, which have been widely studied for the development of atherosclerosis, as they develop spontaneous atherosclerotic lesions and fibrous plaques at the aortic root and branch points, similar to human atherosclerosis (23,24). We therefore maintained apoE^{-/-} mice on a high fat, high cholesterol diet for 12 weeks, a condition known to promote atherosclerotic plaque formation, and treated them daily with either saline or hexarelin. The concentration of 100

$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ hexarelin used in our study was reported to not elicit growth hormone release, and therefore prevented any undesired effects of growth hormone (16, and data not shown). Chronic treatment of mice with hexarelin did not significantly change their weight and food intake, and no adverse health problems were noticed throughout the study. We measured a 10% decrease in total cholesterol and a 33% increase in HDL-associated cholesterol in hexarelin-treated mice (data not shown), which suggests that although these changes did not reach statistical significance, hexarelin is likely to promote circulating cholesterol into the HDL fraction. Plasma triglycerides were not affected, indicating that hexarelin did not induce hypertriglyceridemia, as often observed with the use of LXR ligands (2). To further assess the effect of hexarelin in vivo, we observed that macrophages collected from the peritoneal cavity of ApoE^{-/-} mice fed a cholesterol-rich diet and treated with hexarelin had a reduced ability to accumulate lipids in response to oxLDL loading compared to controls (Fig. 6A). More noticeably, we found that these changes were accompanied by an increase in the expression of PPAR γ (7.5-fold), LXR α (2.9-fold), ABCA1 (1.9-fold), and ABCG1 (1.5-fold) in oxLDL-loaded macrophages from mice treated with hexarelin compared to the saline group (Fig. 6B). In the same conditions, a slight decrease in CD36 expression was observed, while expression of SR-A and GHS-R1a remained unchanged. In order to preclude any undesired effects of the apoE-null phenotype and also to avoid possible activation of PPAR and LXR by exogenous ligands provided with loading of oxLDL, we performed RT-PCR analysis on macrophages collected from wild type C57Bl/6 mice (i.e., same genetic background as the apoE-null), without prior activation with oxLDL. In these

conditions, maximal increases for PPAR γ (2.8-fold), LXR α (1.8-fold), ABCA1 (2.4-fold), ABCG1 (2.1-fold), and apoE (2.4-fold) were obtained in macrophages treated with hexarelin compared to control, while CD36 expression remained unaffected (Fig. 6C). These changes also correlated with protein levels, notably for LXR α and ABCG1 (Fig. 6D). These findings are consistent with the expression profile seen in THP-1 cells (Fig. 2A and 5A), and also indicate that the macrophage PPAR γ -LXR α -ABC pathway could be activated in vivo by hexarelin. Using isolated macrophages from apoE-null mice, we found that the cholesterol efflux was significantly increased in cells treated with hexarelin compared to untreated cells (Fig. 6E). Although the use of peritoneal macrophages may not truly reflect the actions of artery wall macrophages, these results suggest that hexarelin may be sufficient by itself to favor protective mechanisms within macrophages through activation of the PPAR-LXR-ABC pathway and cholesterol removal.

Hexarelin protects apoE-null mice from developing atherosclerotic lesions

We next addressed the question as to whether the response of macrophages to hexarelin could correlate with a beneficial effect on plaque formation induced in apoE-null mice maintained on a lipid rich diet for 12 weeks. *En face* analysis of aortic tree sections stained with oil red O showed a significant reduction of 28% in atherosclerotic lesions in hexarelin-treated mice compared to controls (Fig. 6F and G). These results demonstrate that hexarelin could reduce plaque formation in an animal model of atherosclerosis.

PPAR γ is fully required to mediate the response to hexarelin in peritoneal macrophages

The complete disruption of the *PPAR γ* gene is embryonic lethal in mice and therefore precludes to obtain mature macrophages that lack PPAR γ (25,26). To partly circumvent this, we isolated macrophages from genetically altered PPAR $\gamma^{+/-}$ mice, which are viable and show an impaired PPAR γ function (27), and performed expression analysis in response to hexarelin. We observed that mRNA levels of LXR α , ABCA1, ABCG1, and apoE, all shown to be potently upregulated in wild type macrophages, remained mostly unaffected (fold increases range from 0.8 to 1.4) in PPAR $\gamma^{+/-}$ macrophages treated with hexarelin (fig. 7A). The protein levels of LXR α and ABCG1 were also unaffected in treated PPAR $\gamma^{+/-}$ macrophages (Fig. 7B). This impaired response in PPAR $\gamma^{+/-}$ macrophages strongly supports a functional role for PPAR γ in mediating the effect of hexarelin in macrophages.

Discussion

Alterations in the rates of macrophage cholesterol uptake or efflux each have the potential to influence foam cell formation and the development of atherosclerotic lesions. Therefore, an understanding of the regulatory pathways that control cellular lipid flux may identify new opportunities for intervention in the process of lipid disorders. In this study, we demonstrate the ability of scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor to enhance PPAR γ transcriptional activity in response to hexarelin, a shared peptide ligand. These effects were associated with an enhanced expression of downstream mediators, such as LXR α , apoE, and ABCA1 and ABCG1 transporters that coordinate cholesterol removal from treated mouse macrophages, and a significant reduction in plaque formation in apoE-null mice maintained on a high fat high cholesterol diet.

While activation of PPAR γ by selective agonists was shown to promote beneficial effects in cholesterol removal from macrophages and subsequent plaque reduction in atherosclerotic mice (2), our findings suggest that CD36 and/or GHS-R1a receptors may signal to enhance PPAR γ activity resulting in similar effects on macrophage cholesterol metabolism. As such, given the ability of hexarelin to interfere with oxLDL binding to CD36 (19), thereby lowering the supply in oxidative fatty acids and other potential ligands of PPAR γ , it seems unlikely that activation of PPAR γ by hexarelin would depend on a greater intake of exogenous oxidized lipids by macrophages. In agreement with this, treatment of peritoneal macrophages with hexarelin in absence of oxLDL resulted in an increase of the PPAR γ -LXR α -ABC pathway, suggesting that hexarelin signaling may be

sufficient by itself to activate PPAR γ . In addition, scavenger receptor SRA, which also mediates modified LDL uptake by macrophages, was not upregulated by hexarelin. Our observation that CD36 and/or GHS-R1a ligands enhanced PPAR γ activity may therefore rely on more ligand-independent effects. Consistent with this, we observed that activation of GHS-R1a receptor with hexarelin, or its natural ligand ghrelin (unpublished observations), lead to activation of a PPAR γ construct missing the ligand binding domain, suggesting that such effect may translate through activation of PPAR γ AF-1 function. Ligand-independent activation of PPAR γ has been reported to involve receptor post-translational modifications such as phosphorylation, and our results that hexarelin can promote phosphorylation of PPAR γ in THP-1 cells may therefore provide a basis on how PPAR γ can respond to hexarelin signaling. However, the effects of phosphorylation on PPAR γ activity have been reported to vary, often in opposite directions, given the stimulus, the kinase involved, the modified residue, and the cellular and promoter context (21). For example, PPAR γ activity was enhanced in cells treated with insulin through a MAPK-dependent phosphorylation of its N-terminal region (28-30). Both ligand-dependent and independent activation of PPAR isoforms was shown to require PPAR phosphorylation in response to PKA activators (31). Although the signaling events triggered by the interaction of hexarelin with CD36 remains to be defined, CD36 has been shown to interact with the src kinases Lyn and Fyn to initiate downstream activation of MAPKs in response to ligands such as thrombospondin-1 and β -amyloid (32,33). Similarly, activation of GHS-R1a by ghrelin was shown to initiate a signaling cascade leading to MAPK activation (34-36), and

the neuroprotective effects of hexarelin in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia was correlated with activation of Akt (37). On the other hand, mechanisms related to receptor phosphorylation have also been described to inhibit PPAR γ activity. Phosphorylation of a specific site within its AF-1 domain resulted in an inhibition of ligand-activated PPAR γ and reduced adipocyte differentiation (38-40). Treatment of THP-1 macrophages with TGF β also resulted in PPAR γ phosphorylation and inhibition with a decreased expression of CD36 (41). Therefore, the exact mechanism(s) by which PPAR γ activity is modulated in response to CD36 and/or GHS-R1a ligands remain to be clearly defined. However, given the ability by which post-translational modifications such as phosphorylation could regulate PPAR γ transcriptional activity and that ligand-independent recruitment of transcriptional coregulators is favored by nuclear receptor phosphorylation (21,42), our results suggest that such mechanism may contribute in the cellular response to hexarelin.

It is recognized that CD36 is considered pro-atherogenic. Studies using CD36 null mice have provided evidence that CD36 might favor atherogenesis (43,44), and elevated levels of CD36 has been associated with foam cell formation and atherosclerosis in humans (45). Internalization of oxLDL through CD36 is known to provide a source of fatty acid derivatives that promote PPAR γ activation and further increase in CD36 that results in massive entry of lipids in macrophages (1,7,8). Unexpectedly, we found that although PPAR γ was activated by hexarelin, the expression of CD36 was not increased in cultured and in peritoneal macrophage cells, as opposed to LXR α , also described as a direct target for PPAR γ (7,9). The exact mechanism by which hexarelin exerts such apparent opposite

regulation of CD36 and LXR α expression is not yet clear, but our results suggest that hexarelin signaling might disrupt CD36 upregulation normally seen upon activation of PPAR γ with ligands. Consistent with these findings, we observed in ChIP assay a preferred occupancy of the LXR α promoter by PPAR γ , as opposed to the CD36 promoter, in THP-1 cells treated with hexarelin. Activation of PPAR γ by selective agonists has been shown to differently regulate downstream effectors in macrophage lipid metabolism. For example, troglitazone, in contrast to other PPAR γ ligands, repressed the expression of ABCA1 while increasing CD36 in macrophages, suggesting paradoxical effects on gene expression upon PPAR γ activation (46). More recently, although both PPAR α and PPAR γ selective ligands markedly reduced plaque formation in atherosclerotic mice, they induced an opposite pattern in CD36 expression in isolated peritoneal macrophages of treated mice (20). Clearly, the regulation of CD36 expression may not solely depend on PPAR γ activity as exemplified in this study and others using PPAR γ -deficient macrophages (46). The potential of hexarelin to lower CD36 expression as observed in mouse peritoneal macrophages either from treated animals or maintained in culture, was not as significant as in THP-1 cells, suggesting that in vivo other mechanisms might affect CD36 expression. Inflammatory cytokines and growth factors were described to variably regulate CD36 expression in vascular and peritoneal macrophages (47). These effects were reported to involve both transcriptional and post-transcriptional mechanisms, resulting in changes in the intracellular pool and surface expression of CD36 (47,48). Therefore, we can expect that intracellular signaling triggered by hexarelin and possibly through GHS-R1a, may

likely be involved in limiting CD36 expression as opposed to PPAR γ ligands. Consistent with this, disruption of insulin receptor signaling was shown to result in a post-transcriptional increase of CD36 in macrophages (49). Our observations that protein levels of CD36 were not significantly changed in macrophages treated with hexarelin or with another GHRP selective for CD36 (44), suggest that the cellular mechanism by which steady-state levels of CD36 are maintained but not increased is likely shared among the GHRP class of peptides. Altogether, the apparent different regulation of PPAR γ targets may provide an interesting potential for hexarelin to upregulate PPAR γ -dependent activation pathway toward LXR α , ABC transporters, and cholesterol efflux in macrophages, without increasing CD36 receptor, and therefore limiting its ability to mediate excessive oxLDL uptake, to protect macrophages from becoming foam cells.

The role of the GHS-R1a receptor in atherosclerosis has not well been characterized. GHS-R1a is expressed in a variety of tissues and cell types including macrophages (50). Its natural ligand ghrelin as well as synthetic GHS were shown to mediate endocrine and nonendocrine activities such as growth hormone release, orexigenic action, cardiovascular and anti-proliferative effects, and influence gastro-enteropancreatic functions and adipocyte differentiation (13). For example, treatment of rat adipocytes with ghrelin contributed to significantly increase the expression of PPAR γ and adipogenesis (51). More recently, studies have emerged associating GHS-R1a ligands with anti-inflammatory function in endothelial cells and macrophages. Both GHRP-2 and ghrelin were shown to prevent the endotoxin-induced release of IL-6 from peritoneal macrophages isolated from adjuvant-

induced arthritic rats (52). In addition, ghrelin was reported to inhibit cytokine release and NF κ B activity in human endothelial cells (53). With studies using PPAR isoform-null macrophages that have outlined the role of PPARs in mediating anti-inflammatory processes (54,55), and given the ability of PPAR ligands to inhibit the expression of inflammatory genes in macrophages and other vascular cells (2), it is tempting to speculate that activation of CD36 and/or GHS-R1a by hexarelin might impact the inflammatory response in macrophages through PPAR γ or other PPAR isoforms. In support of such expanded role of hexarelin toward all PPAR isoforms, we found that PPAR α and PPAR δ , but not LXR isoforms, were upregulated, suggesting a selective response of PPARs to hexarelin. In addition, although it is likely that alterations in plasma cholesterol may contribute in part to the beneficial effects of hexarelin, the changes we measured did not obviously reflect the extent of lesion reduction, which may therefore support a role for anti-inflammatory pathways in cooperating to the beneficial effects of hexarelin. Clearly, more studies will be needed to address this possibility.

In summary, we described a novel regulatory pathway to promote the PPAR γ -LXR α -ABC cascade in macrophages involving interaction with CD36 and ghrelin receptor. Such modulation requires PPAR γ and is associated with enhanced cholesterol efflux by macrophages and reduction of lesions in atherosclerotic mice. Consequently, a detailed knowledge of the concerted modulation of CD36 and ghrelin receptor signaling pathways may help to provide additional strategies in pathologic conditions such as atherosclerosis.

Materials and methods

Cell culture and treatments

THP-1 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Macrophage differentiation was initiated with the addition of 5 ng/ml PMA in culture medium for 48 hr. Human embryonic kidney 293 cells and macrophage RAW264.7 cells were cultured in DMEM containing 5% and 10% FBS, respectively. Treatments with troglitazone (1 μ M), hexarelin and GW9662 (Sigma) were replaced with fresh medium every 24 hr. To prepare oxLDL, low density lipoproteins (1.5 μ g/ml) isolated from human plasma (Intracel, Frederick, MD) were oxidized with 5 μ M CuSO_4 for 2 hr at 37°C. The extent of LDL oxidation ranged between 6 and 10 nmol MDA/mg of proteins as determined by the amount of thiobarbituric acid-reactive substances.

Lipid Staining

THP-1 cells were fixed with 3.7% formaldehyde/PBS and stained with oil red O (Sigma). Quantification of lipid accumulation was achieved by extracting oil red O from stained cells with isopropyl alcohol and measuring the optical density of the extracts at 510 nm.

Cholesterol efflux from macrophages

THP-1 cells were differentiated as described above and labeled with 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -cholesterol for 48 hr to allow for equilibration with cellular cholesterol. Cholesterol-loaded cells were washed and incubated in serum-free media containing 0.2% fatty acid free BSA, and efflux was initiated by adding 50 $\mu\text{g/ml}$ HDL in the presence of 10^{-7}M hexarelin or vehicle. The amount of ^3H -cholesterol was measured by liquid scintillation spectrometry in the medium and in the cell lysate (intracellular content) after 16 hr of treatment. Cholesterol efflux is presented as specific % efflux calculated from total counts of the medium and intracellular fractions. Cholesterol efflux was also determined in peritoneal macrophage cells isolated from ApoE-deficient mice (see below). Cells were incubated for 2 hr at a density of 10^6 cells/well in DMEM containing 10% FBS and washed to remove non adherent cells prior to cholesterol efflux determination.

RNA isolation and RT-PCR Analysis

Total RNA was isolated from THP-1 cells using TRIzol reagent (Life Technologies Inc), and from mouse peritoneal macrophages using the RNeasy kit (Qiagen Inc, Valencia, CA), each according to the manufacturer's protocol. RT-PCR analysis was performed as described (44) and relative signal intensities were determined with an image analyzer (Alpha Innotech, San Leandro, CA).

Antibodies and Immunoblotting Analysis

Antibodies to ABCA1 and ABCG1 were obtained from Novus Biologicals, PPAR γ and LXR α from Santa Cruz, and β -actin from Abcam. The antibody against CD36 has been described (19). Antibodies against GHS-R1a were generated by immunizing rabbits with a peptide corresponding to positions 250-262 of human GHS-R1a using a protocol described previously (18). The anti-phosphoserine antibody was from Chemicon. Immunoprecipitation and immunoblotting procedures were performed as described (44,56).

Luciferase Assay

For transient transfection, 293 cells were seeded in DMEM supplemented with 5% charcoal-dextran-treated FBS and plasmid constructs were introduced into cells using the calcium phosphate precipitation method essentially as described (42). Typically, a mixture containing 500 ng of a PPREtkLuc reporter plasmid, 50-100 ng each of pCMX-hPPAR γ and -hRXR α , and 100 ng pcDNA vector encoding human GHS-R1a or CD36 were added in a total of 2 μ g per well. Cells were also transfected with pCMX encoding a Gal4 DBD fusion with PPAR γ or with a LBD-truncated ABCD γ (aa 1-254), and UAStkLuc reporter. Gal4 fusions with PPAR α , PPAR δ , LXR α and LXR β were also used in transfection. RAW264.7 cells were transfected using LipofectAMINE reagent (Life Technologies Inc.) according to the manufacturer's instructions. Following transfection, cells were refed with medium containing receptor ligands for 16h, and harvested for luciferase activity. Luciferase values were normalized for transfection efficiency to β -galactosidase activity

and expressed as relative fold response compared to controls. Luciferase assays were performed in duplicate in at least three independent experiments.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay

ChIP assays were performed as previously described (56). Differentiated THP-1 cells were grown at a density of 10^7 per 100mm dish and treated with troglitazone or hexarelin for 3 hr. Cells were crosslinked with 1% formaldehyde, washed, and resuspended in SDS lysis buffer. Lysates were then sonicated, clarified, and subjected to immunoprecipitation using an anti-PPAR γ antibody (Santa-Cruz). Specific genomic DNA fragments from immunoprecipitated samples and inputs were quantitated by PCR using 2-5 μ l of sample DNA solution and primer pairs encompassing the PPRE containing regions of CD36 (7) and LXR α (22) promoters.

Animals

Both ApoE-deficient mice and wild type C57Bl/6 littermates were previously described (43) and given a standard pelleted diet with water ad libitum. At six weeks of age, male mice were housed individually and maintained on a high fat high cholesterol diet (D12108, cholate-free AIN-76A semi-purified diet containing 40% w/w fat and 1.25% w/w cholesterol; Research Diets Inc., New Brunswick, NJ) for 12 weeks with water ad libitum. During that period, mice were treated with subcutaneous injection of 100 μ g/kg/day hexarelin, a dose known to not promote growth hormone release (16), or 0.9% NaCl

(vehicle). Age-matched PPAR $\gamma^{+/-}$ mice were maintained on standard diet with water ad libitum as described (27). All experimental procedures were done in accordance with the Institutional Animal Ethics Committee of the Université de Montréal, the Canadian Council on Animal Care guidelines and the Cantonal Veterinary Service of the Canton of Vaud for use of experimental animals.

Macrophage isolation and foam cell assay

ApoE-deficient mice were fed a high cholesterol, high fat diet for a period of 6 weeks. Thioglycolate-elicited peritoneal macrophages were collected from both hexarelin-treated and control mice in saline containing 10 U heparin/ml. Peritoneal cells were cultured on sterile glass coverslip in DMEM containing 10% FBS. Adherent cells were incubated with 50 μ g/ml oxLDL for 24 h, fixed in paraformaldehyde and stained for neutral lipids with oil red O. For RT-PCR analysis, apoE-null mice were maintained on the lipid-rich diet for a period of 12 weeks and treated daily with either saline or hexarelin. Prior to collection of macrophages, mice received an intraperitoneal injection of oxLDL (250 μ g/cavity) or 0.9% NaCl. RT-PCR was performed on macrophage RNA as described above. Expression studies were also performed on cultured peritoneal macrophages from age-matched wild type C57Bl/6 and PPAR $\gamma^{+/-}$ mice without prior thioglycolate stimulation and injection of oxLDL. Peritoneal cells were collected and cultured in DMEM containing 10% FBS for 2 hr. Cells were then treated with hexarelin or saline for 24 hr and harvested for RT-PCR and Western analyses.

Histology and morphometric analysis of lesions

For *en face* analysis, the entire aortic section from hexarelin-treated and control mice was dissected out using a stereo-microscope (Nikon, NI-150, Melville, NY), opened longitudinally from the heart to the iliac arteries, and the lesions were stained with oil red O, as described previously (43). Morphometric evaluation of the aortic lesion areas was performed using a video image analysis software (Scion Corp., Fredrick, MD). Data are expressed as the percentage of the total aortic surface area covered by lesions for each treatments.

Acknowledgments

The authors wish to thank Vincent Giguere and Maria Febbraio for providing plasmids. We also acknowledge the expert technical assistance of Eve Marie Charbonneau and Elisabeth Joye. Hexarelin was a generous gift from Europeptides (Argenteuil, France). A.D. holds a doctoral award from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and A.R.W. is supported by a doctoral award from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada. A.T. is a New Investigator of the CIHR. This work was supported by the CIHR, the Canadian Foundation for Innovation, the Swiss National Science Foundation and Ardanna Bioscience (Edinburgh, Scotland).

References

1. **Ricote M, Valledor AF, Glass CK** 2004 Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:230-239
2. **Castrillo A, Tontonoz P** 2004 Nuclear Receptors in Macrophage Biology: At the Crossroads of Lipid Metabolism and Inflammation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:455-480
3. **Desvergne B, Michalik L, Wahli W** 2004 Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. *Mol Endocrinol* 18:1321-1332
4. **Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET** 2000 Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 101:235-238
5. **Chen Z, Ishibashi S, Perrey S, Osuga J, Gotoda T, Kitamine T, Tamura Y, Okazaki H, Yahagi N, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Harada K, Shimano H, Nagai R, Yamada N** 2001 Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:372-377
6. **Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK** 2000 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 106:523-531
7. **Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JGA, Thomazy VA, Evans RM** 1998 PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93:241-252

8. **Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JGA, Chen H, Evans RM** 1998 Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell* 93:229-240
9. **Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P** 2001 A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 7:161-171
10. **Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P** 2001 LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:507-512
11. **Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Van der Ploeg LH, .** 1996 A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974-977
12. **Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K** 2001 Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab* 12:118-122
13. **Lazarczyk MA, Lazarczyk M, Grzela T** 2003 Ghrelin: a recently discovered gut-brain peptide. *Int J Mol Med* 12:279-287
14. **Marleau S, Mulumba M, Lamontagne D, Ong H** 2006 Cardiac and peripheral actions of growth hormone and its releasing peptides: Relevance for the treatment of cardiomyopathies. *Cardiovasc Res* 69:26-35

15. **De Gennaro Colonna V, Rossoni G, Bernareggi M, Muller EE, Berti F** 1997 Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin. *Eur J Pharmacol* 334:201-207
16. **Locatelli V, Rossoni G, Schweiger F, Torsello A, De GC, V, Bernareggi M, Deghenghi R, Muller EE, Berti F** 1999 Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology* 140:4024-4031
17. **Torsello A, Bresciani E, Rossoni G, Avallone R, Tulipano G, Cocchi D, Bulgarelli I, Deghenghi R, Berti F, Locatelli V** 2003 Ghrelin plays a minor role in the physiological control of cardiac function in the rat. *Endocrinology* 144:1787-1792
18. **Bodart V, Febbraio M, Demers A, McNicoll N, Pohankova P, Perreault A, Sejlitz T, Escher E, Silverstein RL, Lamontagne D, Ong H** 2002 CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res* 90:844-849
19. **Demers A, McNicoll N, Febbraio M, Servant M, Marleau S, Silverstein R, Ong H** 2004 Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem J* 382:417-424
20. **Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, Brown KK, Plotkin CR, Pattison JW, Valledor AF, Davis RA, Willson TM, Witztum JL, Palinski W, Glass CK** 2004 Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest* 114:1564-1576
21. **Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W** 2005 Kinase signaling cascades that modulate peroxisome proliferator-activated receptors. *Curr Opin Cell Biol* 17:216-222

22. **Laffitte BA, Joseph SB, Walczak R, Pei L, Wilpitz DC, Collins JL, Tontonoz P** 2001 Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol Cell Biol* 21:7558-7568
23. **Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL** 1992 Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71:343-353
24. **Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N** 1992 Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258:468-471
25. **Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM** 1999 PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4:585-595
26. **Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T** 1999 PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4:597-609
27. **Rieusset J, Seydoux J, Anghel SI, Escher P, Michalik L, Soon TN, Metzger D, Chambon P, Wahli W, Desvergne B** 2004 Altered Growth in Male Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Heterozygous Mice: Involvement of PPARgamma in a Negative Feedback Regulation of Growth Hormone Action. *Mol Endocrinol* 18:2363-2377

28. **Shalev A, Siegrist-Kaiser CA, Yen PM, Wahli W, Burger AG, Chin WW, Meier CA** 1996 The peroxisome proliferator-activated receptor α is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology* 137:4499-4502
29. **Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S, White-Carrington S, Szalkowski D, Moller DE** 1996 Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 271:31771-31774
30. **Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS** 1997 Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). Differential activity of PPAR γ 1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem* 272:20230-20235
31. **Lazennec G, Canaple L, Saugy D, Wahli W** 2000 Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol Endocrinol* 14:1962-1975
32. **Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N** 2000 Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 6:41-48
33. **Moore KJ, El Khoury J, Medeiros LA, Terada K, Geula C, Luster AD, Freeman MW** 2002 A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J Biol Chem* 277:47373-47379
34. **Kim MS, Yoon CY, Jang PG, Park YJ, Shin CS, Park HS, Ryu JW, Pak YK, Park JY, Lee KU, Kim SY, Lee HK, Kim YB, Park KS** 2004 The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 18:2291-2301

35. **Mazzocchi G, Neri G, Rucinski M, Rebuffat P, Spinazzi R, Malendowicz LK, Nussdorfer GG** 2004 Ghrelin enhances the growth of cultured human adrenal zona glomerulosa cells by exerting MAPK-mediated proliferogenic and antiapoptotic effects. *Peptides* 25:1269-1277
36. **Nanzer AM, Khalaf S, Mozid AM, Fowkes RC, Patel MV, Burrin JM, Grossman AB, Korbonits M** 2004 Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Endocrinol* 151:233-240
37. **Brywe KG, Leverin AL, Gustavsson M, Mallard C, Granata R, Destefanis S, Volante M, Hagberg H, Ghigo E, Isgaard J** 2005 Growth hormone-releasing peptide hexarelin reduces neonatal brain injury and alters Akt/glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation. *Endocrinology* 146:4665-4672
38. **Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK** 1997 Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor γ is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen- activated protein kinase site. *Journal of Biological Chemistry* 272:5128-5132
39. **Camp HS, Tafuri SR** 1997 Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ activity by mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 272:10811-10816
40. **Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA** 1998 Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR- γ . *Nature (London)* 396:377-380
41. **Han J, Hajjar DP, Tauras JM, Feng J, Gotto AM, Jr., Nicholson AC** 2000 Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase

phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biol Chem* 275:1241-1246

42. **Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V** 1999 Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor β through phosphorylation of activation function AF-1. *Molecular Cell* 3:513-519
43. **Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL** 2000 Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 105:1049-1056
44. **Marleau S, Harb D, Bujold K, Avallone R, Iken K, Wang Y, Demers A, Sirois M, Febbraio M, Silverstein M, Tremblay A, Ong H** 2005 EP80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *FASEB J* 19:1869-1871
45. **Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M, Nozaki S, Miyagawa J, Nakagawa T, Tamura R, Matsumoto K, Kameda-Takemura K, Yamashita S, Matsuzawa Y** 1999 CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1333-1339
46. **Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Pimprale S, Lee YH, Ricote M, Glass CK, Brewer HB, Jr., Gonzalez FJ** 2002 Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol* 22:2607-2619

47. **Yesner LM, Huh HY, Pearce SF, Silverstein RL** 1996 Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1019-1025
48. **Hsu HY, Nicholson AC, Hajjar DP** 1996 Inhibition of macrophage scavenger receptor activity by tumor necrosis factor-alpha is transcriptionally and post-transcriptionally regulated. *J Biol Chem* 271:7767-7773
49. **Liang CP, Han S, Okamoto H, Carnemolla R, Tabas I, Accili D, Tall AR** 2004 Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages. *J Clin Invest* 113:764-773
50. **Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M** 2002 The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2988
51. **Choi K, Roh SG, Hong YH, Shrestha YB, Hishikawa D, Chen C, Kojima M, Kangawa K, Sasaki S** 2003 The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology* 144:754-759
52. **Granado M, Priego T, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A** 2005 Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E486-E492
53. **Li WG, Gavrilu D, Liu X, Wang L, Gunnlaugsson S, Stoll LL, McCormick ML, Sigmund CD, Tang C, Weintraub NL** 2004 Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation* 109:2221-2226

54. **Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Curtiss LK, Boisvert WA, Evans RM** 2003 Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science* 302:453-457
55. **Welch JS, Ricote M, Akiyama TE, Gonzalez FJ, Glass CK** 2003 PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6712-6717
56. **St Laurent V, Sanchez M, Charbonneau C, Tremblay A** 2005 Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94:23-37

Figure Legends

Fig. 1. Effects of Hexarelin on Lipid Accumulation and Cholesterol Efflux in Human THP-1 Macrophages

(A) RNA and protein levels of CD36 and GHS-R1a receptors were measured in pre-differentiated and PMA-differentiated THP-1 cells. (B) Representative images of differentiated THP-1 cells incubated with 50 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL for 24 hr in the presence or absence of 10^{-7} M hexarelin. Lipids were stained with oil red O. (C) THP-1 cells were incubated for 24 hr with hexarelin and/or 50 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL as indicated. Lipids were stained with oil red O, extracted and quantified by photometry. Data are presented as mean \pm SEM of at least 3 separate experiments. * $P < 0.02$ and ** $P < 0.01$ versus controls. (D) Hexarelin promotes cholesterol efflux from THP-1 cells. THP-1 cells were loaded with ^3H -cholesterol and incubated with vehicle or 10^{-7} M hexarelin. Efflux was measured 16 hr following addition of 50 $\mu\text{g/ml}$ HDL acceptors. Data are presented as the percentage (\pm SEM) of efflux relative to the total radioactivity in the cells and medium calculated from three independent experiments. * $P < 0.02$.

Fig. 2. Hexarelin Stimulates the PPAR γ -LXR α -ABC Pathway in THP-1 Macrophages

(A) RT-PCR analysis from THP-1 cells treated or not with 10^{-7} M hexarelin for 48 hr. Representative images of mRNA expression are shown for the indicated genes. (B) Time

study of THP-1 cells treated with 10^{-7} M hexarelin. Relative amounts of mRNA for the indicated genes were quantified by densitometry. Data are presented as relative fold changes (\pm SEM) compared to undifferentiated cells, obtained from 3-4 separate experiments. (C) Representative Western analysis of THP-1 cells treated with 10^{-7} M hexarelin.

Fig. 3. Hexarelin Signals to Activate PPAR γ

(A) Inhibition of PPAR γ activity impairs the increase in LXR α , ABCA1, and ABCG1 protein levels by hexarelin. PMA-differentiated THP-1 cells were treated with 10^{-7} M hexarelin and with 1 and 5 μ M of the PPAR γ inhibitor GW9662 for 48 hr and analyzed by Western. (B) Murine RAW264.7 macrophage cells were transfected with the expression plasmid coding for Gal4-PPAR γ in the presence of the reporter gene UAS γ tkLuc. Cells were then treated with 1 μ M troglitazone (Tro), or hexarelin for 16 hr prior to harvest. Results are expressed as fold changes in luciferase activity compared to untreated cells, determined from duplicates from at least three independent experiments. (C) Activation of PPAR γ by hexarelin through CD36 and GHS-R1a receptors. Human 293 cells were transfected with Gal4-PPAR γ plasmid and UAS γ tkLuc reporter, and treated with 10^{-7} M or 10^{-5} M hexarelin for 16 hr before harvest. Cells were cotransfected with CD36 and/or GHS-R1a expression plasmid as indicated. Normalized reporter activity was determined and presented as fold change \pm SEM compared to untreated cells set at 1.0. (D) Activation of PPAR γ by hexarelin is dose-dependent. 293 cells were transfected with a PPRE γ tkLuc

reporter and expression vectors for PPAR γ and RXR α in absence (open circle), or presence of a plasmid coding for GHS-R1a (filled circles) or CD36 (open squares). After transfection, cells were treated with increasing doses of hexarelin and harvested for luciferase activity. Each points represent the % changes (mean \pm SEM) compared to untreated cells set at 100%. (E) Hexarelin can promote the activity of PPARs but not LXRs. 293 cells were transfected with Gal4 fusions of PPAR or LXR isoforms as indicated, in the presence of the UAS κ Luc reporter and GHS-R1a plasmid. Cells were treated with receptor ligands or hexarelin for 16 hr prior to harvest for luciferase activity. Ligands used are WY14643 (1 μ M) for PPAR α , carbacyclin (1 μ M) for PPAR δ , and 22R-hydroxycholesterol (5 μ M) for LXRs. Results are expressed as in (B).

Fig. 4. GHS-R1a-dependent Transactivation of PPAR γ by Hexarelin is Ligand-Independent

(A) Hexarelin promotes PPAR γ AF-1 activity. Human 293 cells were transfected with Gal4 fusions of full length PPAR γ or a ligand binding domain-truncated ABCD γ (aa1-254), and the UAS κ Luc reporter in the presence or absence of GHS-R1a. After transfection, cells were treated with 10⁻⁷ M hexarelin or left untreated for 16 hr prior to harvest. Results are expressed as fold changes compared to untreated cells which were arbitrarily set at 1.0 for each PPAR γ construct. (B) Dose-response of cells transfected with Gal4-ABCD γ and treated with increasing concentrations of hexarelin as indicated. Cells were either mock transfected (open circles) or transfected (filled circles) with a GHS-R1a plasmid. Each

points represent the % changes (mean \pm SEM) compared to untreated cells set at 100%. (C) Hexarelin promotes PPAR γ phosphorylation in THP-1 macrophages. THP-1 cells were differentiated, serum-deprived and treated with hexarelin for the indicated time. Cell extracts were immunoprecipitated with an antibody against PPAR γ and analyzed by Western blot using an anti-phosphoserine antibody. PPAR γ content was also monitored by Western analysis.

Fig. 5. The Expression of CD36 and GHS-R1a is not Increased by Hexarelin in THP-1 Macrophages

(A) THP-1 cells were treated with 10^{-7} M hexarelin for 48 hrs and analyzed for GHS-R1a, CD36 and SR-A expression by RT-PCR. GAPDH expression was used as a loading control. (B) Representative Western analysis of GHS-R1a and CD36 receptors in THP-1 cells treated as in (A). β -actin was used as a loading control. (C) ChIP analysis of PPAR γ recruitment to CD36 and LXR α promoters in response to hexarelin. THP-1 cells treated with troglitazone (Tro) or hexarelin for 3 hr were subjected to ChIP analysis using an antibody against PPAR γ . PCR was performed on immunoprecipitated DNA from samples and on total DNA extracted (input), using pairs of primers that cover the PPRE-containing regions of CD36 and LXR α gene promoters as shown. The fold changes compared to untreated THP-1 cells represent the mean of two independent experiments.

Fig. 6. Activation of the PPAR γ -LXR α -ABCA1/G1 Pathway in Peritoneal Macrophages and Reduction of Atherosclerotic Lesions in ApoE-null Mice Treated with Hexarelin

(A) Representative images of oil red O-stained peritoneal macrophages from apoE^{-/-} mice kept on a high fat, high cholesterol diet for 6 weeks and treated with daily s.c. injections of 0.9% NaCl or 100 μ g/kg/day hexarelin. Thioglycolate-elicited macrophages were collected from treated mice and incubated in vitro with oxLDL prior to lipid staining. (B) Enhanced PPAR γ -LXR α -ABC pathway in peritoneal macrophages from ApoE^{-/-} mice treated with hexarelin. ApoE-null mice were treated as in (A), and peritoneal macrophages were collected after injection of oxLDL or saline, and subjected to RT-PCR analysis for the indicated genes. (C) Hexarelin promotes the PPAR γ -LXR α -ABC pathway in C57Bl/6 mouse peritoneal macrophages. Macrophages were collected from C57Bl/6 mice maintained on a standard diet and treated in culture with increasing amounts of hexarelin for 24 hr. Cells were harvested and RT-PCR analysis was performed as in (B). (D) Macrophages were isolated and treated as in (C) and harvested for Western analysis. (E) Hexarelin increases cholesterol removal from mouse macrophages. Cholesterol efflux to HDL was determined in peritoneal macrophages collected from apoE-null mice and incubated for 16 and 24 hrs with 10⁻⁷ M hexarelin or vehicle. Also shown are the basal rates without HDL acceptors. Data are presented as the percentage (\pm SEM) of efflux relative to the total radioactivity in the cells and medium calculated from four independent experiments. * $P < 0.05$ versus respective controls. (F) Reduction of atherosclerotic lesions in apoE-null

mice fed a high fat, high cholesterol diet for 12 weeks and treated with hexarelin as compared to mice treated with saline. The entire aortic root was dissected and stained for lipids using oil red O for *en face* analysis. (G) Quantification of aortic tree lesion area in mice treated with hexarelin compared to controls. Aortic surface covered by oil red O-stained lesions was quantified and expressed as a percent of the total aortic area. * $P < 0.01$ versus controls.

Fig. 7. Activation of the LXR α -ABCA1/G1 Pathway by Hexarelin in Peritoneal Macrophages is Dependent on PPAR γ

(A) The activation of the LXR-ABCA1/G1 pathway by hexarelin is severely impaired in PPAR $\gamma^{+/-}$ macrophages. Peritoneal macrophages were collected from PPAR $\gamma^{+/-}$ mice maintained on a standard diet and treated in culture with hexarelin for 24 hrs. Cells were harvested and RT-PCR analysis was performed from two separate experiments. (B) LXR α and ABCG1 proteins were not increased by hexarelin in PPAR $\gamma^{+/-}$ macrophages. PPAR $\gamma^{+/-}$ peritoneal macrophages were collected and treated as in (A) prior to be harvested for Western analysis. Equal amounts of proteins were loaded in each well.

Figures

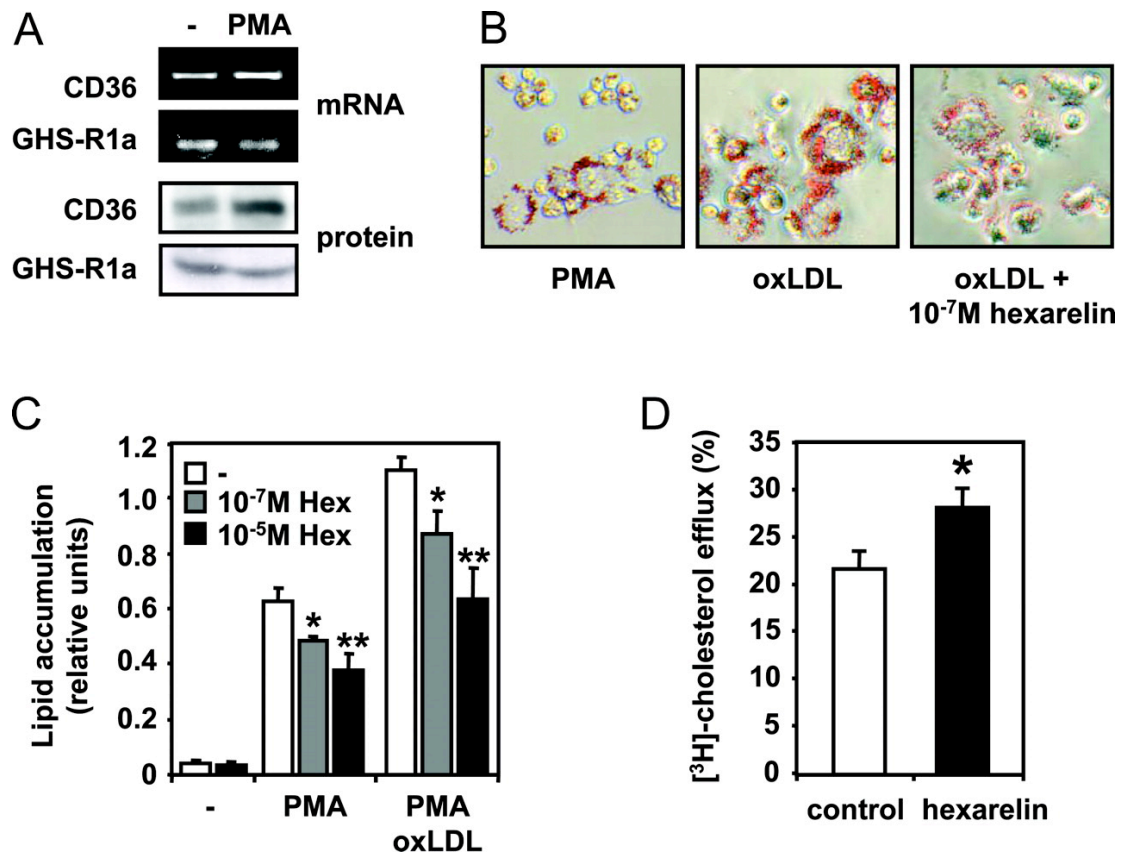


Fig.1

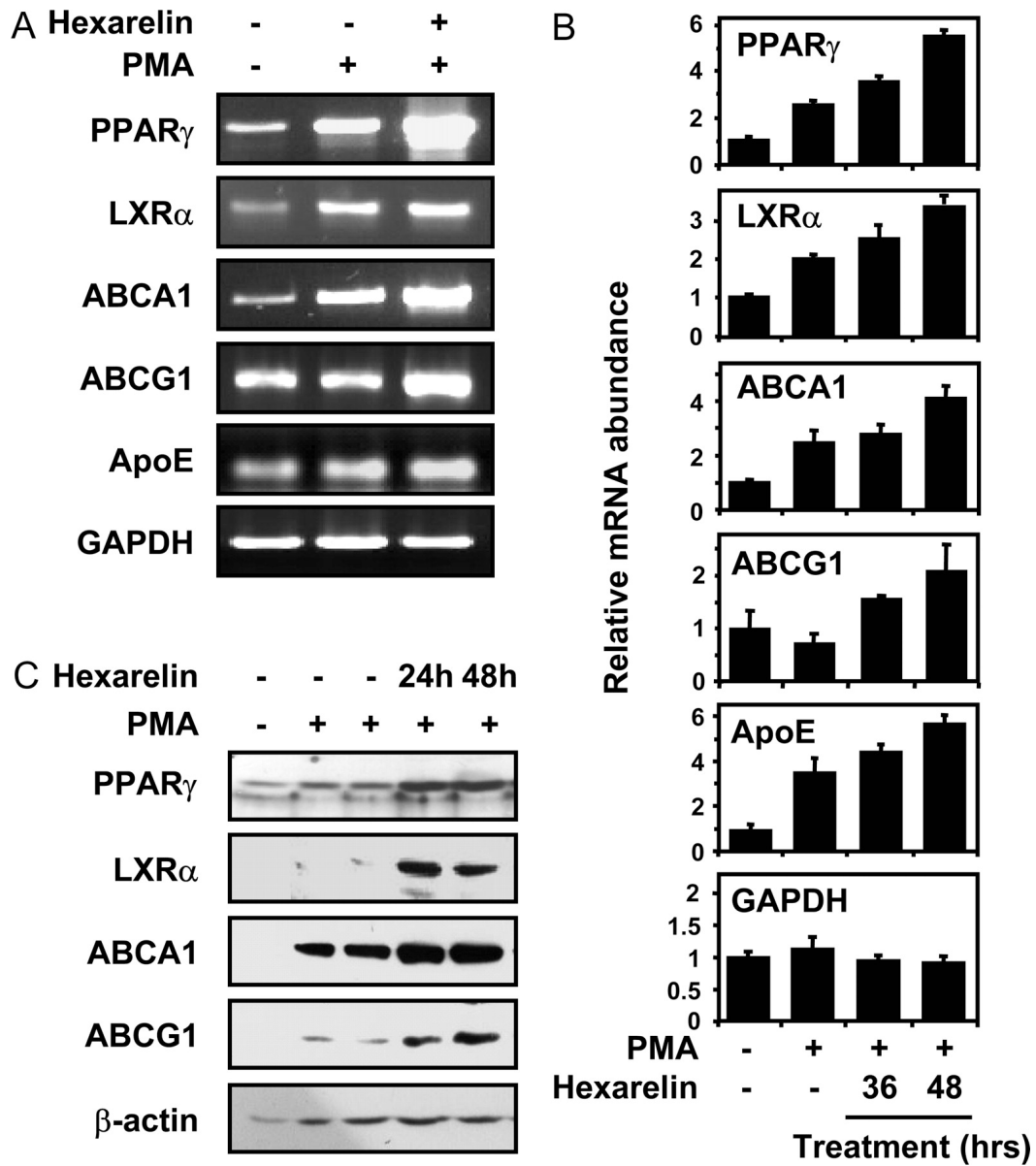


Fig.2

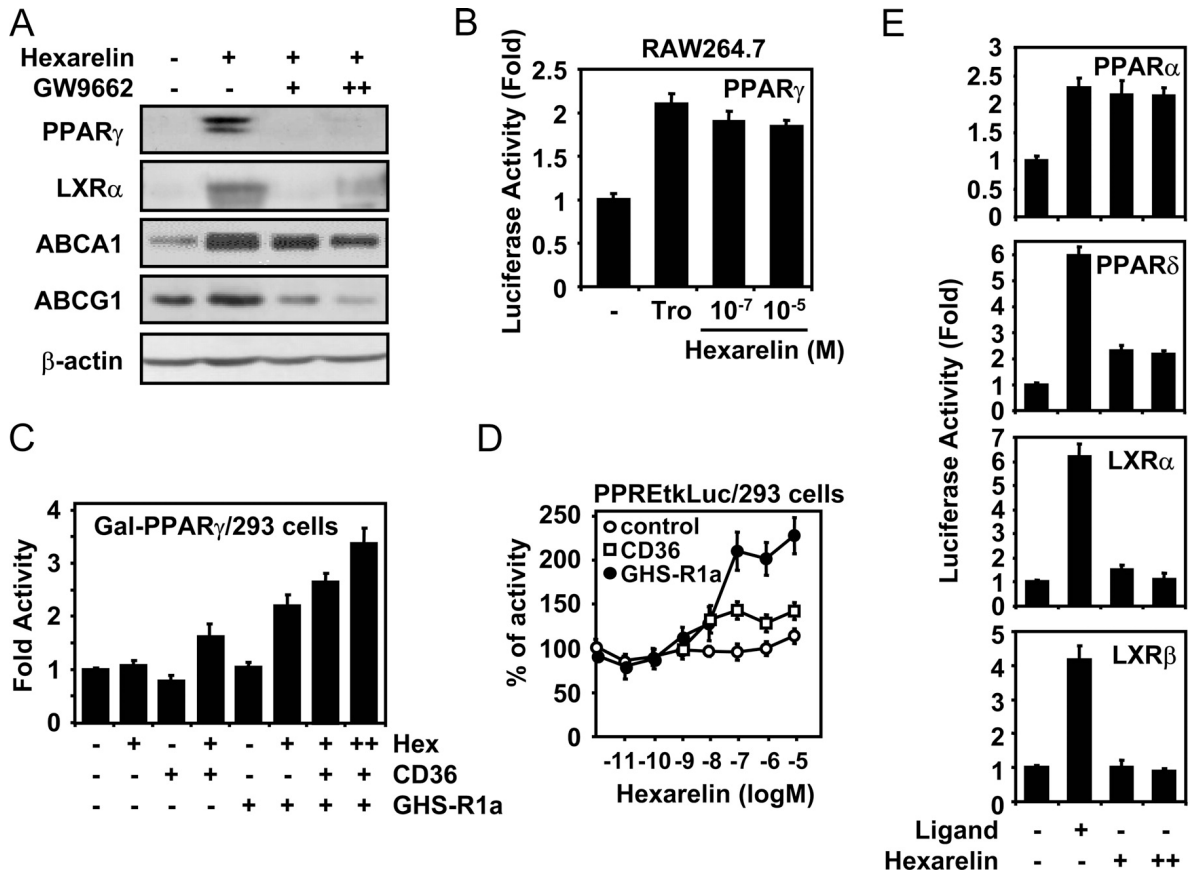


Fig.3

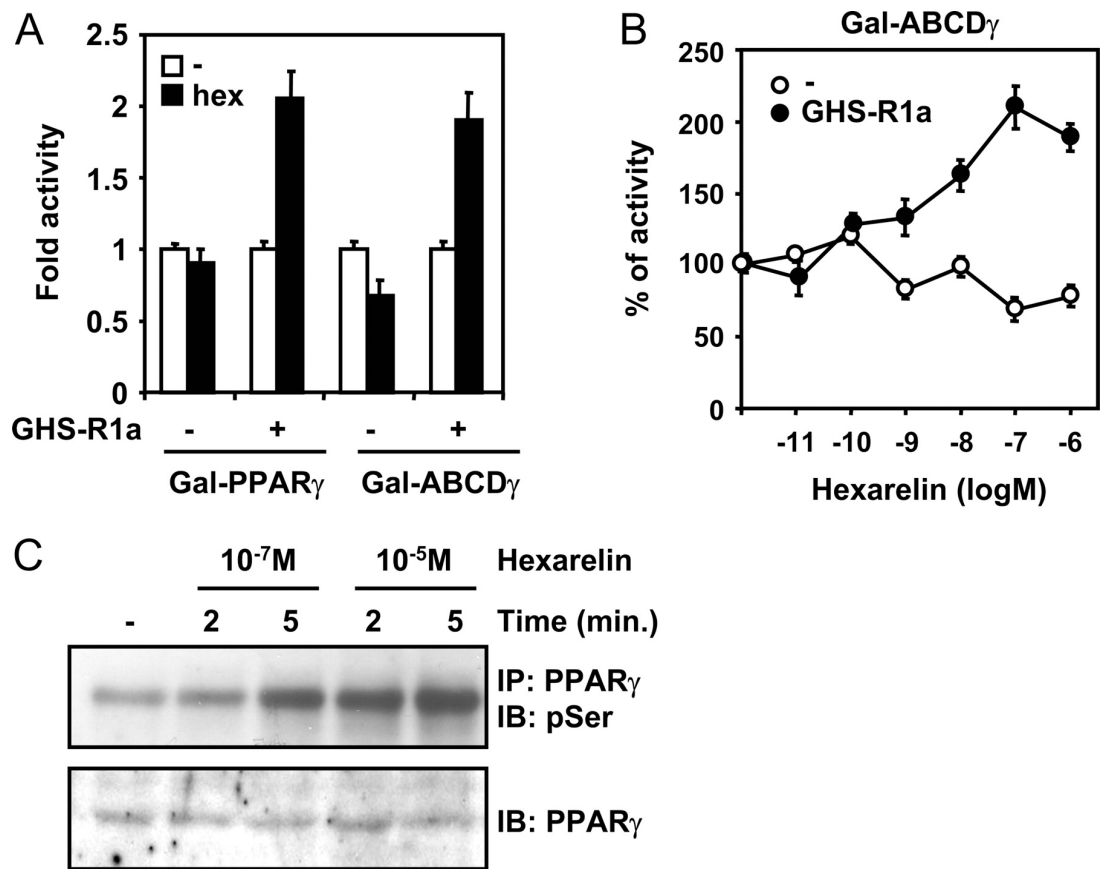


Fig.4

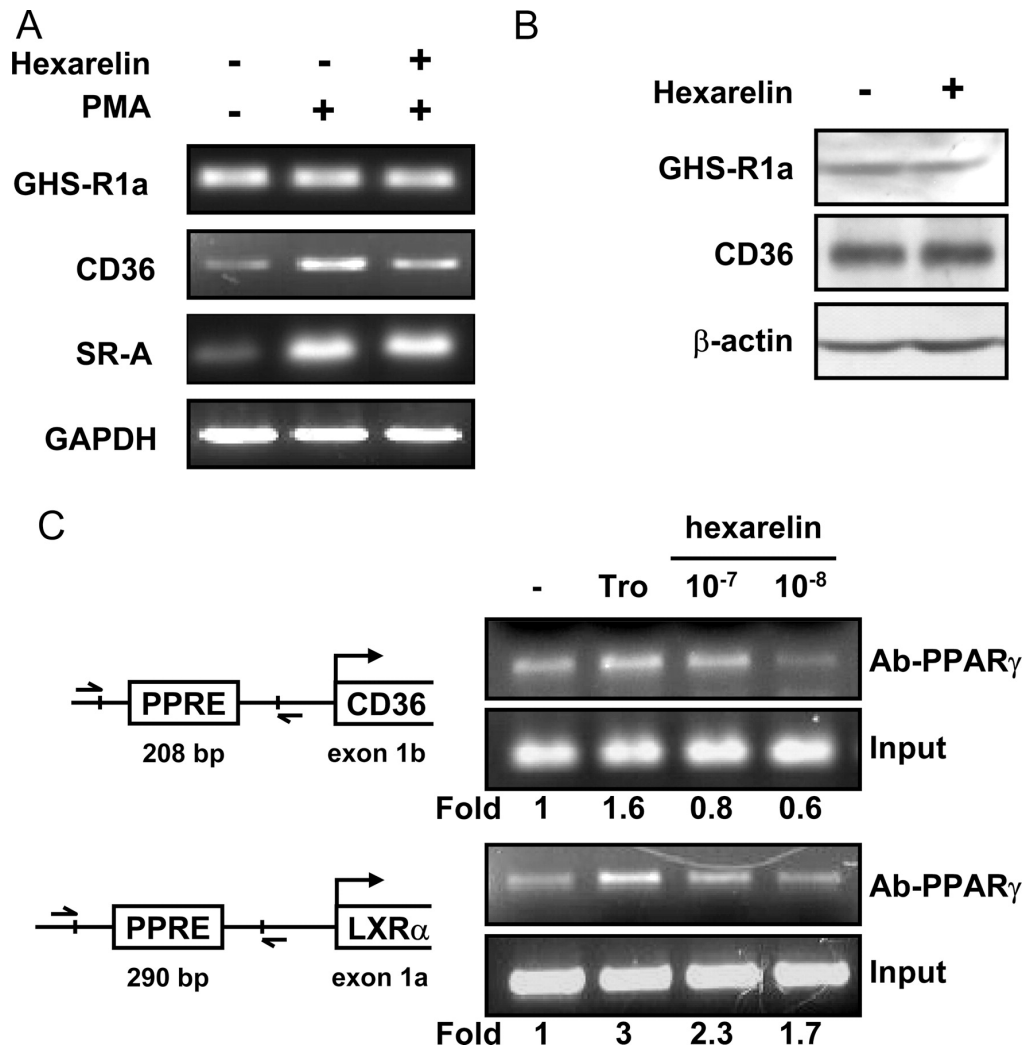


Fig.5

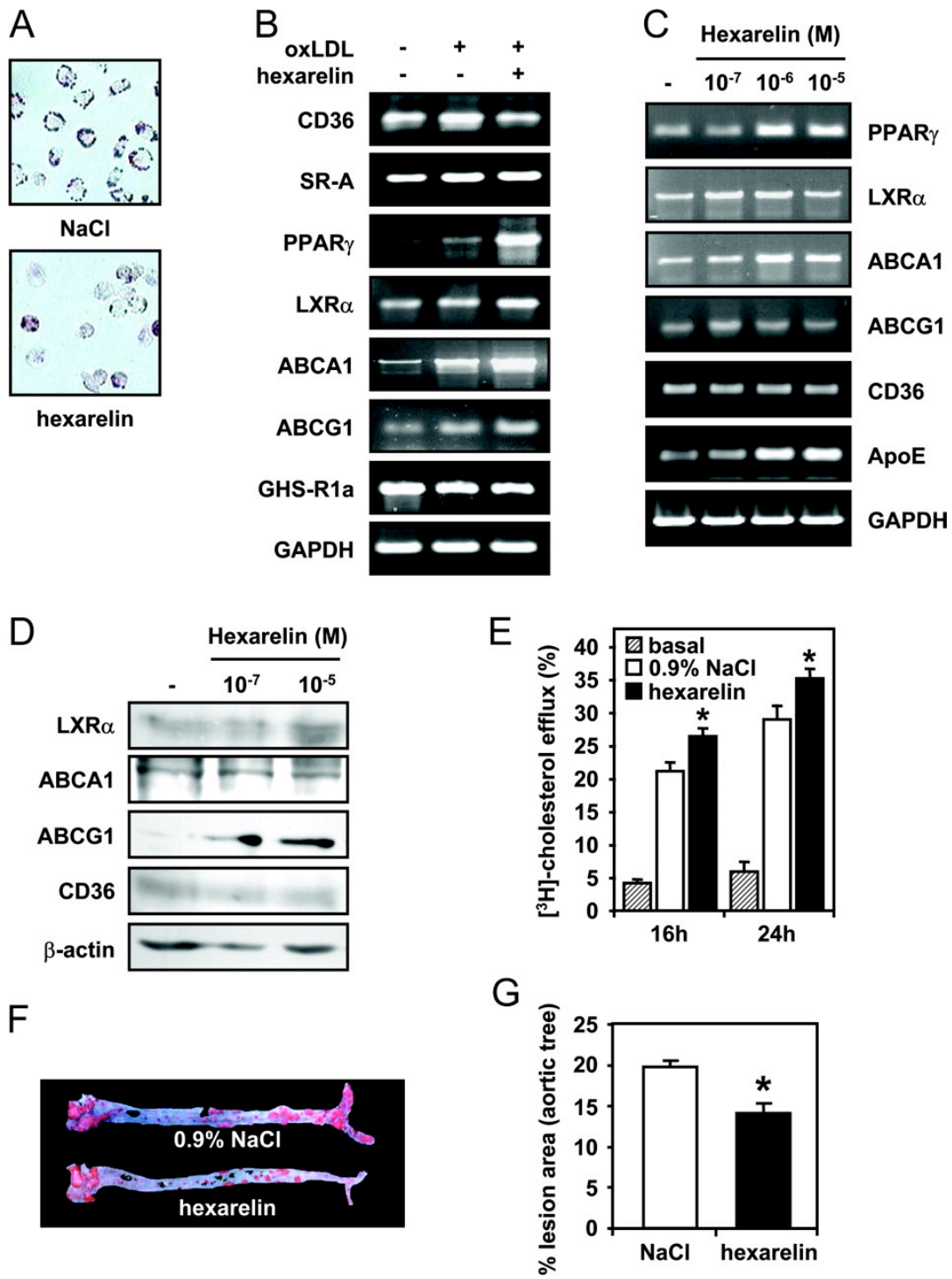


Fig.6

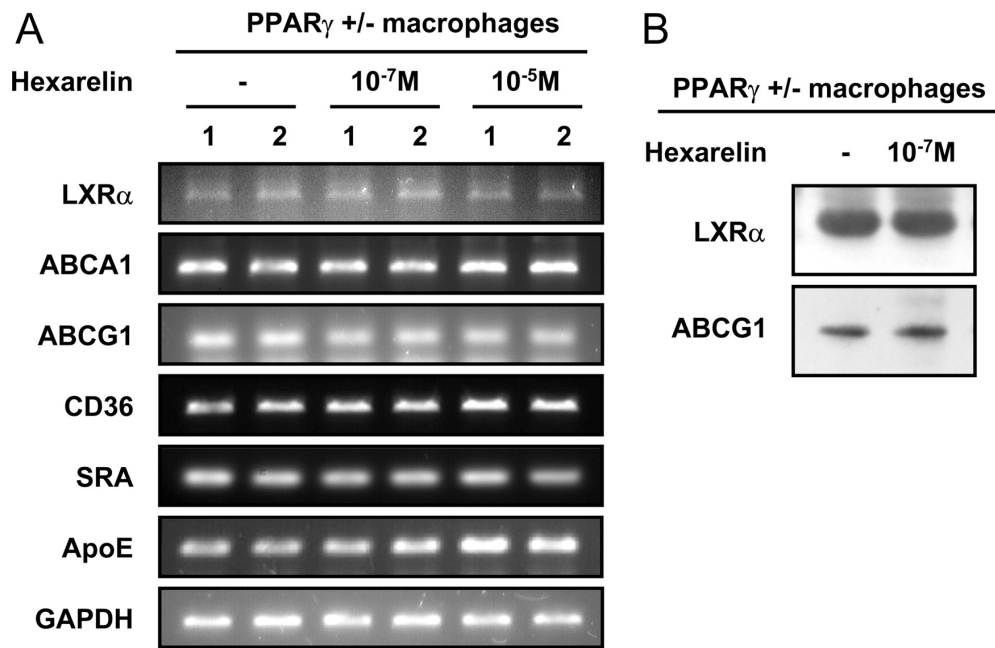


Fig.7

Chapitre 6 : La ghréline et le macrophage

A Concerted Kinase Interplay Identifies PPAR γ as a Molecular Target of Ghrelin Signaling in Macrophages

Annie Demers^{1,2}, Véronique Caron^{1,3}, Amélie Rodrigue-Way^{1,3}, Walter Wahli⁴, Huy Ong², and André Tremblay^{1,3,5}

¹Research Center, CHU Ste-Justine, ²Faculty of Pharmacy, and Departments of ³Biochemistry and ⁵Obstetrics & Gynecology, University of Montreal, Montréal, QC, H3T 1C5, Canada ⁴Center for Integrative Genomics, National Research Center Frontiers in Genetics, University of Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

Keywords: ghrelin receptor; GHS-R1a; Src kinase; Fyn kinase; THP-1; AF-1; AF-2; MAPK/Erk; PI3-K; Akt; LXR α ; ABCA1; ABCG1; sterol transporter; cholesterol; atherosclerosis.

Short title: Ghrelin signaling to PPAR γ

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have no competing interests.

Correspondence should be addressed to:
André Tremblay, Research Center, Ste-Justine Hospital, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), H3T 1C5, Canada.

Avant-Propos

L'activation des récepteurs CD36 et GHS-R1a en termes de signalisation attire de plus en plus l'attention. La connaissance relative des propriétés de signalisation de GHS-R1a et la publication d'évidences expérimentales suggérant sa distribution dans les tissus périphériques le désigne comme un modèle approprié et novateur pour étudier les conséquences physiologiques de son éventuelle activation sur le macrophage. Nous avons démontré lors de la première étude que l'activation des récepteurs CD36 et GHS-R1a par l'hexaréline stimule l'activité transcriptionnelle de PPAR γ . Très rapidement, nos résultats ont montré que l'activation unique du récepteur de la ghréline active le récepteur nucléaire PPAR γ et la nature de la cascade de signalisation mise en jeu était complètement inconnue. Le processus de signalisation des GPCRs, incluant celui du récepteur de la ghréline, est très diversifié et à cet effet nous avons exploré de nombreux mécanismes avant d'identifier ceux qui sont impliqués dans la régulation de l'activité de PPAR γ . Nous mettons ici en évidence un mécanisme intrigant et complexe de régulation issu de la concertation entre différentes voies de signalisation qui permet à PPAR γ d'intégrer plusieurs signaux dans sa réponse transcriptionnelle au niveau du macrophage.

Contribution de chacun des auteurs de la publication no 2 :

A.D.	Conceptualisation du projet, expériences, stratégie expérimentale, analyse des résultats, écriture de l'article
A.R.-W.	Discussion
V.C.	Expériences de RT-PCR et analyse (fig 1), essai luciférase (fig 2C et 6G) et coimmunoprecipitation (fig 5E)
H.O.	Initiation et conceptualisation du projet
A.T.	Conceptualisation du projet et écriture de l'article

Résumé

Le récepteur activé par les proliférateurs du peroxyosome PPAR γ joue un rôle essentiel dans la biologie vasculaire et modulant la fonction du macrophage et la progression des lésions athérosclérotiques. Récemment, nous avons montré une nouvelle voie régulatrice du métabolisme lipidique du macrophage via l'activation de PPAR γ impliquant le récepteur de la ghréline, GHS-R1a, ainsi que le récepteur CD36 et ayant le potentiel de contrer l'évolution de l'athérosclérose. Alors que l'implication de la boucle autorégulatrice PPAR γ -CD36 dans l'athérogenèse est bien caractérisée, la relation de signalisation entre le GHS-R1a et PPAR γ demeure inconnue. Nous démontrons ici que la ghréline active PPAR γ par un mécanisme de concertation entre les kinases Erk1/2 et Akt, qui se résulte en une augmentation de l'expression des gènes cibles LXR α et des transporteurs de stérols de type ABC dans les macrophages. Ces effets sont associés à une augmentation de la phosphorylation de PPAR γ et sont indépendants de la sérine inhibitrice 84. Nous avons aussi observé le recrutement de la tyrosine kinase Fyn au GHS-R1a suite à la stimulation par la ghréline. De plus, l'échec de Fyn activé à augmenter la phosphorylation spécifique de Ser-84 est relié au recrutement parallèle de la protéine Dok-1, qui empêche l'activation optimale de la voie Erk1/2. La mutation de Ser-84 préserve l'augmentation d'activité transcriptionnelle de PPAR γ en réponse à l'inhibition de Src, ce qui supporte un mécanisme indépendant de Ser-84 dans la réponse à la ghréline. Nous montrons également que la ghréline active la voie PI3-K/Akt de façon dépendante à G α_q , ce qui favorise le recrutement de Akt par PPAR γ , augmente la phosphorylation et l'activation indépendante de Ser-84 de PPAR γ et augmente l'expression de LXR α et ABCA1/G1.

Collectivement, ces résultats illustrent un ensemble complexe de signalisation impliquant Fyn/Dok-1/Erk et $G\alpha_q$ /PI3-K/Akt dans la transduction du signal de la ghreline vers PPAR γ dans le macrophage.

Summary

The peroxisome proliferator-activator receptor PPAR γ plays an essential role in vascular biology, modulating macrophage function and atherosclerosis progression. Recently, we have described the beneficial effect of combined activation of the ghrelin/GHS-R1a receptor and the scavenger receptor CD36 to induce macrophage cholesterol release through transcriptional activation of PPAR γ . While the interplay between CD36 and PPAR γ in atherogenesis is well recognized, the contribution of the ghrelin receptor to regulate PPAR γ remains unknown. Here, we demonstrate that ghrelin triggers PPAR γ activation through a concerted signaling cascade involving Erk1/2 and Akt kinases, resulting in enhanced expression of downstream effectors LXR α and ABC sterol transporters in human macrophages. These effects were associated with enhanced PPAR γ phosphorylation independently of the inhibitory conserved serine-84. Src tyrosine kinase Fyn was identified as being recruited to GHS-R1a in response to ghrelin, but failure of activated Fyn to enhance PPAR γ Ser-84 specific phosphorylation relied on the concomitant recruitment of docking protein Dok-1, which prevented optimal activation of the Erk1/2 pathway. Also, substitution of Ser-84 preserved the ghrelin-induced PPAR γ activity and responsiveness to Src inhibition, supporting a mechanism independent of Ser-84 in PPAR γ response to ghrelin. Consistent with this, we found that ghrelin promoted the PI3-K/Akt

pathway in a $G\alpha_q$ -dependent manner, resulting in Akt recruitment to PPAR γ , enhanced PPAR γ phosphorylation and activation independently of Ser-84, and increased expression of LXR α and ABCA1/G1. Collectively, these results illustrate a complex interplay involving Fyn/Dok-1/Erk and $G\alpha_q$ /PI3-K/Akt pathways to transduce in a concerted manner responsiveness of PPAR γ to ghrelin in macrophages.

Introduction

Ghrelin is an acetylated 28 amino acid hormone initially identified from the stomach, which induced the release of growth hormone (GH) from the pituitary and regulates food intake, energy homeostasis and adiposity [1,2]. Cellular signals carried by ghrelin are transduced by the growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a), a 7-transmembrane-domain G-protein-coupled receptor mainly expressed in hypothalamus and pituitary [3]. In somatotroph cells, the activation of GHS-R1a by ghrelin induces GH release through enhanced phospholipase C activity, protein kinase C and intracellular calcium mobilization [4]. However, in concordance with the peripheral distribution of GHS-R1a, including vascular endothelium, myocardium and monocytes [5-7], emerging evidence indicates that ghrelin and its receptor have a variety of GH releasing-independent cardiovascular and anti-inflammatory activities [8-10]. Attempts to elucidate the peripheral cardiovascular effects of ghrelin have identified several signaling mechanisms involving both classical G-protein effectors and G-protein independent pathways, highlighting the complexity of GHS-R1a activation [11-14]. In endothelial cells, ghrelin has been shown to modulate Erk, Akt kinase, nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activities, in the regulation of cell proliferation and vascular inflammation [7,12,15-17]. Ghrelin also inhibited proliferation of human aortic smooth muscle cells through a cAMP/PKA activation pathway [18]. However its role in the macrophage biology have not yet been described.

Macrophages are central players for key early events in atherogenesis. The accumulation of oxidized cholesterol-rich low density lipoproteins (oxLDL) into the intima and their subsequent uptake by monocyte-derived macrophages, leads to the formation of the characteristic cholesterol-loaded foam cells. Oxidized fatty acids and oxysterol, generated as a result of oxLDL uptake by macrophages, act as ligands for the nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and liver X receptor α (LXR α) respectively, which are part of a metabolic cascade resulting in enhanced expression of downstream genes, such as apolipoprotein E (ApoE) and ATP binding cassette (ABC) sterol transporters involved in cholesterol efflux [19-21]. An important role of PPAR γ in exerting overall beneficial anti-atherosclerotic effects has been provided with the ability of thiazolidinediones, identified as high affinity synthetic PPAR γ agonists with potent insulin sensitizing properties, to reduce macrophage intracellular cholesterol levels [22-25].

We recently reported that a growth hormone secretagogue which interact with both the GHS-R1a receptor and the scavenger receptor CD36 markedly decreased plaque formation in apoE-null mice fed a high fat diet, a condition known to promote atherosclerosis [26,27]. Our studies have further demonstrated that these beneficial effects were dependent on the transcriptional activation of PPAR γ and enhanced expression of LXR α and ABCA1/G1 transporters, thereby leading macrophages to mobilize excess cholesterol into the HDL reverse pathway [26]. The metabolic cascade involving PPAR γ and LXR α was proposed as an attempt by the macrophage to enhance its ability to remove

oxLDL from the vessel wall acting through the positive regulation of CD36. While the role of CD36 receptor in mediating oxLDL uptake and PPAR γ activation in macrophages is recognized, the cellular events by which GHS-R1a activation may regulate PPAR γ activity and dependent gene expression remain unknown.

To understand how ghrelin and GHS-R1a might impact cholesterol metabolism in macrophages, we therefore investigated the intracellular signal transduction pathways involved in GHS-R1a activation and the ability of ghrelin to regulate PPAR γ activity and dependent gene expression. Our results identify an intricate and complex kinase signaling interplay, which is triggered by ghrelin modulates in a concerted fashion PPAR γ -dependent transcriptional competence in macrophages.

Results

Ghrelin Stimulates the PPAR γ -LXR α -ABCA1/G1 Transporters Pathway in THP-1 Macrophages

We previously reported that hexarelin, a GH secretagogue that interacts with both CD36 and GHS-R1a receptors, activated the PPAR γ -LXR α -ABCA1/G1 transporter pathway in macrophages [26]. To evaluate the role of the GHS-R1a receptor in the regulation of cholesterol efflux effectors in the macrophage, we treated PMA-differentiated THP-1 macrophages with increasing doses of ghrelin (1, 10, and 100 nM), and measured the expression of components of the PPAR γ -LXR α -ABC pathway. Our results showed that ghrelin elicited a dose-dependent increase in LXR α , ABCA1, and ABCG1 mRNA expression, as well as for GHS-R1a, with values reaching 1.8-, 1.7-, 2.2-, and 2.1-fold respectively, when treated with 100 nM ghrelin compared to untreated differentiated cells (Figs. 1A and B). These changes were paralleled with enhanced LXR α and ABCG1 protein levels (Fig. 1C). Whereas PPAR γ gene expression was not significantly changed by ghrelin, a 3.5-fold increase in protein levels was observed, probably reflecting a reduced turnover of PPAR γ , as also reported in THP-1 cells treated with GH secretagogues [26,27]. CD36 mRNA and protein levels remained unchanged following ghrelin treatment, as opposed to macrophages treated with the PPAR γ agonist rosiglitazone (figs. 1A and B, and data not shown). This distinct regulation of CD36 was also reported in response to hexarelin and shown to depend on a selective recruitment of PPAR γ to CD36 promoter in differentiated

macrophages [26,27]. To ensure whether PPAR γ was required to mediate the increase in gene expression to ghrelin, we used a shRNA lentiviral-knockdown approach to impair PPAR γ expression as described [28]. We found that silencing PPAR γ expression in THP-1 cells impaired the induction of LXR α and ABCA1 gene expression normally observed with ghrelin (Fig. 1D), in line with an essential role of PPAR γ in mediating responsiveness to ghrelin in macrophages. These results indicate that activation of the GHS-R1a receptor by ghrelin stimulates the expression of components of the PPAR γ -LXR α -ABC pathway in THP-1 macrophages.

Ghrelin Promotes PPAR γ Transcriptional Activity through the AF-1 Domain

To directly assess whether ghrelin signals to activate PPAR γ , we used a luciferase reporter assay in which embryonic kidney 293 cells were transfected in presence or absence of the GHS-R1a receptor, along with a Gal4-PPAR γ expression plasmid and a UAS γ Luc reporter. As shown in figure 2A, cells expressing GHS-R1a showed a 1.7-fold increase in PPAR γ transcriptional activity in response to ghrelin when compared to untreated cells. To determine which part of PPAR γ conferred such responsiveness to ghrelin, we used truncated ABCD and CDEF constructs of PPAR γ in which the transcriptional active domains AF-2 and AF-1 were respectively removed. We found that ghrelin promoted the activity of the Gal4-ABCD γ to a similar extent as to the full-length receptor, whereas no significant activation of the CDEF γ construct was observed (Fig. 2B). These data suggest that GHS-R1a activation by ghrelin increases the ligand-independent activity of PPAR γ through activation of its N-terminal AF-1 domain.

Ghrelin Promotes PPAR γ 1 Phosphorylation Independent of Serine 84 in Macrophages

It has been reported that phosphorylation of AF-1 conserved serine 84 of PPAR γ 1 and Ser-112 of PPAR γ 2 by MAPK/Erk resulted in PPAR γ transcriptional inhibition in adipocytes [29,30]. Consequently, we tested the implication of this site in the modulation of PPAR γ activity by ghrelin, both in transfected 293 cells and in THP-1 macrophages. As expected, mutation of Ser-84 with alanine (PPAR γ S84A) removed the inhibition potential of this site on PPAR γ 1 activation in 293 cells treated or not with rosiglitazone (Fig. 2C). Interestingly, a similar enhancement in PPAR γ S84A activity was observed in cells transfected with GHS-R1a and treated with ghrelin, reaching a near 3-fold increase in response to 100 nM ghrelin compared to 2.2-fold in cells transfected with wt PPAR γ (Fig. 2C), indicating that PPAR γ S84A was responding to ghrelin, therefore precluding a role of PPAR γ Ser-84 in mediating ghrelin responsiveness. To test the role of Ser-84 in the response of macrophages to ghrelin, we performed immunoblot analysis using a PPAR γ phospho-Ser-84 specific antibody on cell extracts immunoprecipitated with an anti-PPAR γ . No increase in phosphorylation was detected on Ser-84 site of PPAR γ in response to ghrelin (Fig. 2D). However, when using a total phospho-serine antibody, we observed that ghrelin strongly stimulated in a time- and dose-dependent manner the phosphorylation of PPAR γ in THP-1 cells. These results indicate that ghrelin might induce kinase signaling pathways through the GHS-R1a receptor, which promote PPAR γ phosphorylation independently of Ser-84.

The Effects of Ghrelin on PPAR γ Are Independent of the Epidermal Growth Factor Receptor

A wide range of extracellular signals are transduced by G-protein-coupled receptors (GPCR), and among others, it has been proposed that for several GPCR agonists, the epidermal growth factor receptor (EGFR) can be used as an intermediate to trigger MAPK/Erk activation and mitogenic signaling [31,32]. While such role of EGFR has not been clearly defined in the peripheral actions of ghrelin, we tested whether EGFR was involved in GHS-R1a-mediated activation of MAPK by ghrelin in macrophages using the EGFR selective AG1478 inhibitor. We found that whereas a short time exposure of 5 minutes of THP-1 macrophages with ghrelin induced Erk activation in a manner partly dependent on EGFR activity, no significant effect of EGFR inhibition was observed on longer treatment periods, such as 15 and 30 minutes (Fig. 3A and data not shown), suggesting a mild and transient role of EGFR in ghrelin responsiveness of macrophages. However, whether such apparent contribution of EGFR was meaningful, it had no significant effect on PPAR γ activation by ghrelin (Fig. 3B), and both total serine and Ser-84 phosphorylation of PPAR γ in ghrelin-treated cells were not significantly affected upon EGFR inhibition (Fig. 3C). In contrast, the EGFR inhibitor completely abolished the increase in PPAR γ phosphorylation induced by treating cells with TNF- α , a cytokine reported to promote MAPK activation and suppression of PPAR γ activity in pre-adipocytes [33]. These results suggest the existence of other mechanisms independent of EGFR by which GHS-R1a regulates PPAR γ activity in macrophages.

Activation and Recruitment of Fyn Kinase to the GHS-R1a Receptor

Non-receptor Src-family tyrosine kinases have been reported to directly interact with GPCR receptors [31,34]. Src tyrosine kinase signaling has also been shown to play a central role in proatherogenic responses mediated by oxidized lipid metabolites in vascular smooth muscle cells implicated in atherosclerotic lesion formation [35,36]. In an attempt to further investigate GHS-R1a signaling to PPAR γ , the contribution of Src-family kinases as downstream effectors of GHS-R1a signaling was evaluated. Our findings revealed a strong time-dependent increase in response to ghrelin of Src tyrosine 418 phosphorylation (pY418), a hallmark of Src-related kinase activation, reaching nearly a 4-fold induction compared to untreated THP-1 cells (Fig. 4A). This activation was impaired in cells treated with the Src inhibitor PP2, a pyrazolopyrimidine derivative highly selective for Src, Fyn and Yes tyrosine kinases at the concentration used, whereas pretreatment with the PI3-K inhibitor LY294002 had minor effect.

In line with such activation of members of the Src family in response to ghrelin and according to the integrative role of Fyn in the metabolic regulation of lipids as recently described in peripheral tissues [37], we determined whether Fyn kinase was involved in the transduction of ghrelin signal in macrophages. Immunoprecipitation and Western analysis of activated Fyn in THP-1 cells revealed a strong time-dependent increase in Fyn tyrosine phosphorylation in response to ghrelin (Fig. 4B). To further ascertain the role of Fyn in the activation of GHS-R1a by ghrelin, we found that ghrelin induced a favored recruitment of activated Fyn kinase to the GHS-R1a in a time- and dose-dependent manner in THP-1 cells, reaching a 5-fold increase within 30 min of treatment (Fig. 4C). Addition of the GHS-R1a

antagonist (D-Lys3)-GHRP-6 completely abolished the recruitment of activated Fyn to the GHS-R1a receptor (Fig. 4D). These results identify Fyn kinase as a signaling intermediate in the activation of the GHS-R1a receptor.

Fyn Kinase Restrains the Inhibitory Effect of Erk1/2 on PPAR γ Activity

Src tyrosine kinases have been involved in the ability of GPCRs to induce Erk1/2 activity [31]. Since our results suggest a role for Fyn kinase in GHS-R1a signaling, we assessed the impact of Src/Fyn inhibition on Erk1/2 activation in response to ghrelin. Interestingly, in the presence of PP2 inhibitor, THP-1 macrophages showed a respective 2- and 3-fold increase in Erk1/2 phosphorylation in response to 15 and 30 minute treatment with ghrelin, compared to cells not treated with PP2 (Fig. 5A). In addition, such activation of Erk1/2 upon Src/Fyn inhibition correlated with an increase in PPAR γ phosphorylation, more specifically at Ser-84, in THP-1 cells treated with ghrelin in the presence of PP2 inhibitor (Fig. 5B). In line with the inhibitory role of Ser-84 phosphorylation on PPAR γ activity, we next tested the influence of Src/Fyn inhibition on ghrelin-mediated activation of PPAR γ . As shown in figure 5C, PPAR γ transcriptional response to GHS-R1a expression and activation was strongly impaired in the presence of PP2 inhibitor, an effect that required the integrity of Ser-84. A similar inhibitory effect of PP2 was also observed on the activation of PPAR γ to thiazolidinedione ligands (data not shown), supporting the inhibition potential of Erk on PPAR γ response to ligands [38]. To ascertain the specific implication of Fyn kinase in modulating PPAR γ Ser-84 phosphorylation by Erk1/2, we found that ectopic expression of Fyn in the presence of GHS-R1a in 293 cells caused a strong inhibition of

Erk1/2 phosphorylation, which correlated with a time-dependent decrease of PPAR γ Ser-84 phosphorylation in response to ghrelin (Fig. 5D). Altogether, our results emphasize a role for Fyn activation to restrain the inhibitory potential of Erk1/2 on PPAR γ Ser- 84, therefore allowing a maximal response of PPAR γ to ghrelin.

Ghrelin Promotes Activation of the Docking Protein Dok-1 and Its Recruitment to Fyn Kinase

The apparent activating role of Fyn on PPAR γ activity through a negative regulation of Erk1/2 is rather intriguing and suggests that other components may modulate Src/Fyn response to ghrelin. One interesting candidate is the docking protein Dok-1 which was described as a negative regulator of the Ras/MAPK pathway and mitogenic signaling in immune cells [39,40]. Indeed, Dok-1 becomes tyrosine phosphorylated following activation of receptor and cytoplasmic tyrosine kinases, including Src kinases Lyn and Fyn [41], and overexpression of Dok-1 was shown to inhibit Erk1/2 activation induced by Fyn in 293 cells [42]. To determine the possible implication of Dok-1 in the inhibitory effect of Fyn on Erk1/2 activity, we examined the phosphorylation status of endogenous Dok-1 and its ability to interact with Fyn kinase in response to ghrelin. Using 293 cells transfected with Dok-1 in the presence of GHS-R1a, we found that phosphorylation of Dok-1 was increased in response to ghrelin (Fig. 5E). In addition, this activated Dok-1 was co-precipitated with phosphorylated Fyn in the same conditions, indicating that ghrelin promotes activation of Dok-1 and Fyn recruitment. Both tyrosine phosphorylation of Dok-1 and recruitment of activated Fyn were completely inhibited in the presence of PP2 inhibitor and were shown to

be dependent on Dok-1 Tyr-146 (Fig. 5E), a phosphorylation site involved in the ability of Dok-1 to inhibit Erk1/2 [43]. These observations on the association between Fyn and Dok-1 were also reproduced in THP-1 macrophages. Indeed, endogenous Dok-1 was shown to be increasingly tyrosine phosphorylated and recruited to activated Fyn in response to ghrelin, both of which being abolished by the PP2 inhibitor (Fig. 5F). Taken together, these findings suggest that the activation and recruitment of Fyn kinase to GHS-R1a in response to ghrelin, promotes the recruitment of Dok-1, thus forming a repressive complex by which Erk1/2 activation and its inhibitory effect on PPAR γ activity through Ser-84 phosphorylation is minimized in macrophages.

The PI3-K/Akt Pathway Promotes PPAR γ Activation by Ghrelin

Our interpretation that the inhibition potential of Src or Fyn may restrain Erk1/2 activity through Dok-1 recruitment, therefore relieving Erk1/2 inhibition on PPAR γ activity, may not fully explain how ghrelin activates PPAR γ . This is especially emphasized by the fact that ghrelin could enhance Erk1/2 in THP-1 cells, resulting in a potential inhibition of PPAR γ , and by an increased phosphorylation of PPAR γ independent of Ser-84 (Fig 5A and B). This prompted us to consider whether the PI3-K/Akt signaling pathway could be involved in the ghrelin-mediated activation of PPAR γ . As such, we observed that treatment of THP-1 macrophages with ghrelin increased in a time-dependent manner the phosphorylation of Akt and of p85 regulatory subunit of PI3-K, indicating an activation of the PI3-K/Akt pathway (fig 6A). These responses did not seem to be mediated by Src-

related kinases, as the PP2 inhibitor had no significant effect. Further supporting a role for the PI3-K/Akt pathway, we found that pretreatment with the PI3-K inhibitor LY294002, prior to stimulation with ghrelin, completely abolished the effects of ghrelin on PPAR γ activity (Fig. 6B) and serine phosphorylation (Fig. 6C). Also, transient coexpression of Akt with a constitutively active p110 α PI3-K in 293 cells, which results in potent activation of Akt [44], led to a 1.6- and 1.7-fold increase in the activity of PPAR γ and PPAR γ S84A respectively, compared to mock-transfected cells (Fig. 6D), reaching values observed with ghrelin activation of GHS-R1a (Figs. 2C and 5C). Such activation of PPAR γ by the PI3-K/Akt pathway also correlated with an enhanced recruitment of Akt to PPAR γ in response to ghrelin (Fig. 6E). Neither PPAR γ 1 Ser-84, nor its conserved Ser-112 in PPAR γ 2, seems to behave as a critical determinant in PPAR γ response to ghrelin-activated PI3-K/Akt pathway (Figs. 6C and E). Altogether, these results emphasize a predominant role of the PI3-K/Akt pathway in mediating PPAR γ activation by ghrelin.

Activation of G α_q Subunit Is Required for the Ghrelin-Induced Akt and PPAR γ Activation

Based on recent reports that have implicated the Gq proteins in the central effects of ghrelin on GHS-R1a signaling in pituitary cells [45,46], and on their possible convergence with the Akt pathway in endothelial cells [16], we wanted to determine whether the activation of PPAR γ by ghrelin was dependent on G-protein signaling pathway in macrophages. As shown in figure 6F, pretreatment of THP-1 cells with the G α_q inhibitory peptide GP-Antagonist-2A completely abrogated the activation of Akt by ghrelin. Also,

Gαq inhibition resulted in the suppression of the transcriptional response of PPARγ to ghrelin (Fig. 6G), whereas PKC inhibitors, such as staurosporine and GF109203X, had no significant effects (data not shown). These data identify the α subunit of Gq protein as a signaling intermediate of the GHS-R1a to activate the Akt pathway and PPARγ transcription potential in macrophages.

The PI3-K/Akt Pathway Plays a Critical Role in the Activation of the PPARγ-LXRα-ABC Metabolic Cascade by Ghrelin

In order to establish whether activation of the PI3-K/Akt pathway was involved in the upregulation of PPARγ-dependent gene expression, we tested the effects of the PI3-K inhibitor LY294002 on the expression profile of downstream effectors, such as LXRα and ABC sterol transporters in THP-1 macrophages. Our results indicate that the increased levels observed in LXRα, ABCA1 and ABCG1 expression upon treating cells with ghrelin were strongly impaired with the inhibition of PI3-K (Fig. 7A). Similarly, these effects were paralleled with decreases in PPARγ, LXRα, and ABCG1 protein levels (Fig. 7B). These findings suggest a prominent role of the PI3-K/Akt pathway in mediating ghrelin responsiveness of macrophages to activate the PPARγ-LXRα-ABC metabolic cascade.

Discussion

PPAR γ plays a central role in coordinating the macrophage response to lipid loading through a transcriptional cascade involving LXR α and the ABC transporters A1 and G1 [19-21]. As such, PPAR γ agonists of the thiazolidinedione family were shown to exert beneficial anti-atherosclerotic actions by promoting activation of the PPAR γ -LXR α -ABC pathway and cholesterol efflux [22-25]. Consequently, modulation of PPAR γ activity is critical to the control of cholesterol metabolism in macrophages and atherosclerotic vascular lesion progression. Emerging evidence suggests that ghrelin has important and beneficial effects on the vascular system, by ameliorating endothelial dysfunction [16,47] and inhibiting proliferation of aortic smooth muscle cells [18]. However, ghrelin's action on the macrophage is still not well defined. In line with our previous work, which described a role for scavenger CD36 and GHS-R1a/ghrelin receptors to regulate cholesterol efflux in macrophages through a PPAR γ -dependent pathway [26-27], this study identifies a complex signaling pathway that, upon activation of GHS-R1a receptor with ghrelin, results in the enhancement of PPAR γ transcriptional activity and subsequent target gene activation in THP-1 macrophages. Such modulation of PPAR γ activity implicates modification of its phosphorylation status through the interplay of two signaling pathways, one being mediated by Fyn/Dok-1/Erk1/2, which mainly restrains the inhibition potential of PPAR γ serine 84/112, whereas the second involves G α q/PI3-K/Akt that promotes PPAR γ activation. Therefore, our findings identify ghrelin as a novel regulator of PPAR γ activation via GHS-R1a-mediated concerted pathways in macrophages.

Members of the MAP kinase family have been implicated in the regulation of PPAR γ phosphorylation and activity in response to external signals, such as platelet derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), and insulin [29,48,49]. In particular, phosphorylation of PPAR γ 1/2 at conserved MAPK consensus position 84/112 is well known to reduce the transcriptional response of PPAR γ to activating ligands and mitogens in adipocytes, leading to inhibition of cell differentiation and adipogenesis [29], [30,48]. Genetic studies are also consistent with a role of PPAR γ Ser-112 in fat metabolism and glucose homeostasis, as S112A knock-in mice exhibit increased PPAR γ activity with protective effects from obesity-associated insulin resistance [50]. The present study demonstrates that the positive effect of ghrelin on PPAR γ transcriptional activation is associated with an increase in PPAR γ phosphorylation, which is not dependent on Ser-84, even if ghrelin promoted the activation of Erk. In trying to understand the molecular basis for such ligand-independent activation of PPAR γ , we found that GHS-R1a efficiently recruited and activated the Src kinase Fyn in THP-1 macrophages treated with ghrelin. This specific recruitment and activation of Fyn through GHS-R1a restrained Erk1/2 activation and PPAR γ phosphorylation on Ser-84, resulting in the release of Ser-84 inhibitory potential. Recent evidence has provided a role for Fyn as an essential regulator of adipogenesis and fat cell function. The requirement of Fyn and other Src-family tyrosine kinases has been demonstrated in insulin-induced fat accumulation using Src, Yes and Fyn triple knock out embryonic fibroblasts stably expressing PPAR γ 2 [51]. Likewise, genetic disruption of Fyn has recently been associated with peripheral tissue insulin sensitivity through modulation of AMP kinase activity [37]. In line with such potential role of Fyn to

regulate adipogenesis in a context in which PPAR γ is established as essential, we identify Fyn as a metabolic regulator that modulates PPAR γ transcriptional potential and downstream events in macrophages.

The Src-family tyrosine kinases are typically recognized to activate Erk1/2 in various cells [14,31], and to our surprise, inhibiting Src kinases with PP2 enhanced the activation of Erk1/2 by ghrelin in macrophages, resulting in increased phosphorylation on PPAR γ Ser-84 and consequently decreased PPAR γ activity. To further characterize the molecular basis of such inhibition of Erk by Fyn in the context of ghrelin, we identified Dok-1 as a potent recruiting partner of activated Fyn kinase in response to ghrelin. Dok-1 has been reported to negatively regulate Erk1/2 for tyrosine kinase receptors such as the insulin receptor, by associating with Src [40]. We extend these findings to Fyn kinase, which by recruiting Dok-1, defines a GHS-R1a/Fyn/Dok-1 signaling pathway in macrophages, which then prevents excessive Erk1/2 activation in the presence of ghrelin. We propose that this GHS-R1a/Fyn/Dok-1 pathway is used to alleviate the inhibitory potential of Ser-84/112 phosphorylation on PPAR γ activity, therefore resulting in enhanced PPAR γ -dependent response to ghrelin. Consistent with such repressive role of Dok-1 on macrophage PPAR γ activity, it was recently reported that Dok-1 is essential to mediate adipocyte response to insulin, by antagonizing activation of the Ras/Erk1/2 pathway that would otherwise maintain basal phosphorylation of PPAR γ Ser-112 and limit its ability to promote terminal differentiation of adipocytes [52].

Our findings that Dok-1 is used to restrain the inhibitory potential of Erk on PPAR γ might not fully explain how ghrelin achieves PPAR γ activation in macrophages. Signaling

of ghrelin receptor is complex and multiple pathways with frequent cross-talk of signaling components have been described in several cell types. Although not clearly defined for GHS-R1a receptor, the EGFR was proposed as an intermediate partner in transducing Erk activation by GPCRs [31]. Also, ghrelin was described to activate cAMP-dependent protein kinase in aortic endothelial cells [15] and several isoforms of calcium-dependent protein kinase [14,32]. Notwithstanding their potential role in transducing ghrelin responsiveness to other cellular factors, our results indicate that these pathways are unlikely to be involved in GHS-R1a mediated PPAR γ activation in macrophages.

Interestingly, the observation that ghrelin promoted activation of the PI3-K/Akt pathway, which then resulted in enhanced activation of PPAR γ , provides a mean by which ghrelin can initiate positive signals to PPAR γ in macrophages. Akt was described to mediate ghrelin responsiveness in various cells [11,16,53,54] and this activation was recently shown to be dependent on both a G α i/o-protein-coupled and β -arrestin scaffolded complex in 3T3-L1 cells [54]. In addition, expression of an activated form of Akt was described to trigger spontaneous adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipose cells [55], [56], in support of a role of Akt in regulating PPAR γ in fat cells. Here, we demonstrate that the PI3-K/Akt pathway acts as a positive regulator of PPAR γ function in macrophages, by promoting the induction of the PPAR γ -LXR α -ABC metabolic cascade that governs cholesterol removal from these cells. The activation of Akt by ghrelin is a result of a distinct signaling pathway, which is independent of Src-related activity but required G α q coupling to GHS-R1a receptor, emphasizing the complexity of ghrelin signaling in macrophages.

Although PPAR γ was shown to be phosphorylated independently of Ser-84 upon activation of Akt, no consensus site for Akt has been identified in PPAR γ 1/2, suggesting that the activation potential of Akt on PPAR γ is probably indirect. Numerous transcriptional coactivators that facilitate PPAR γ activity have been described, some of which being directly regulated by Akt [57]. For instance, we showed that PPAR γ can benefit from the enhanced transcriptional potential of CREB binding protein (CBP) in response to activated Akt pathway [44], making CBP a likely cofactor that might potentiate PPAR γ response to ghrelin-activated Akt pathway. Clearly, further studies are needed to identify the exact activation mechanism by which PPAR γ responds to enhanced PI3-K/Akt pathway in macrophages, and how this process might selectively be facilitated through cofactor usage.

Collectively, our results establish a GHS-R1a signaling pathway that functions to regulate PPAR γ transcriptional potential in macrophages, which implicates ghrelin and GHS-R1a in the removal of cholesterol from vascular atherosclerotic lesions. In line with such beneficial role of macrophage GHS-R1a receptor, we previously demonstrated the anti-atherogenic properties of hexarelin, a hexapeptide ligand that binds to both scavenger CD36 and GHS-R1a receptors [26,58]. Given that ghrelin also decreases the release of proinflammatory cytokines in monocytes and T lymphocytes from T cells and monocytes [59], our findings raise the interesting possibility that ghrelin might have the potential to reduce atherosclerotic lesion development, which might represent an important mechanism for the recognized cardiovascular protection of ghrelin observed in animal models and humans [8-10]. In addition, it seems reasonable to speculate that the Dok-1 mediated inhibition of Erk1/2 could also predict the anti-atherogenic effects of ghrelin, given the high

impact of elevated MAPK pathway in atherosclerosis [60,61]. Altogether, our findings provide a cellular basis for the peripheral actions of ghrelin and the immediate response of PPAR γ -regulated pathways that have potential important implications for the treatment of human vascular diseases.

Materials and methods

Plasmids Constructs

pCMX expression plasmids coding for mouse PPAR γ 2, human PPAR γ 1, and Gal4-PPAR γ ABCD (aa 1-254) have been described previously [26]. The N-terminal truncated Gal4-PPAR γ CDEF construct was generated by amplifying the aa 109-477 fragment of hPPAR γ by PCR. The PPAR γ 1 Ser-84 to alanine and the PPAR γ 2 Ser-112 to alanine mutants were generated by PCR mutagenesis and confirmed by automated sequencing. The mutations were confirmed by automated sequencing. The luciferase reporter constructs UAS γ tkLuc and PPRE γ tkLuc, as well as plasmids for Akt and its inactive K179M mutant, and for constitutively active p110 α catalytic subunit of PI3-K have been described [26,44]. The expression plasmid coding for Fyn kinase and Dok-1 were kindly provided by M. Resh and P. Duplay respectively.

Cell culture

Human monocytes THP-1 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. Macrophage differentiation was initiated with the addition of 5 μ g/ml phorbol myristate acetate (PMA) in culture medium for 48 h to 72 h. Human embryonic kidney 293 cells were cultured in DMEM containing 5% fetal bovine serum (FBS). Treatments with

rosiglitazone (1.4 μ M) and ghrelin (1-100 nM) were replaced with fresh medium every 24 h.

RNA Isolation and qPCR Analysis

Total RNA was isolated from THP-1 cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) and RT-PCR analysis was performed as described [62,63]. PCR products were analyzed on a MX3000P (Stratagene, La Jolla, CA) and on gel (Alpha Innotech, San Leandro, CA) from at least three separate experiments. All values were normalized against GAPDH expression.

RNA interference

To silence PPAR γ expression, small hairpin RNA duplexes targeting the sequence AAAGCAAAGGCGAGGGCGATCTT of human PPAR γ (shPPAR γ) were inserted into the pLVTH lentiviral vector for small interfering RNA production. Viral particles were produced in 293T cells as described [28,63], and used to infect THP-1 macrophages. PPAR γ efficient knockdown was monitored by Western analysis (data not shown).

Antibodies

Antibodies to PPAR γ , LXR α , Fyn (for Western Blot), phospho-p85, p85, phosphotyrosine, phospho-Akt (Ser-473) and Dok-1 were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Antibodies to ABCG1 were obtained from Novus Biologicals (Littleton,

CO), anti-PPAR γ phospho-Ser-84 and anti-Fyn (for immunoprecipitation) from Upstate (Lake Placid, NY) and, anti-Src phospho-Tyr-418 from Calbiochem (Darmstadt, Germany), anti-Erk1/2 from Invitrogen (Carlsbad, CA), and β -actin from Abcam (Cambridge, MA). The anti-phospho-serine antibody was obtained from Chemicon (Temecula, CA), and the anti-Akt from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Antibodies against CD36 and GHS-R1a [26,64], and HA [63,65] have been described.

Immunoprecipitation and Immunoblotting Analysis

Immunoprecipitation and immunoblotting procedures were done essentially as described [27,66]. Briefly, for immunoprecipitation assay, cells were washed in ice-cold PBS, and lysed in RIPA buffer consisting of 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitors (Roche, Laval, Qc) in PBS. Cell lysates were precleared before incubation with respective antibodies and protein A-agarose at 4°C. Immunoprecipitates were then washed in lysis buffer, resolved by SDS-PAGE, and analyzed by immunoblotting. For coimmunoprecipitation assay, cells lysates were lysed in a modified RIPA containing 1% NP-40 and 0.25% deoxycholic acid. Proteins were then resolved by SDS-PAGE and subjected to Western analysis. Membranes were blocked with blocking reagent (Roche) or 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline, probed with selected antibodies, and signals visualized by enhanced chemiluminescence using appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies.

Luciferase Reporter Assay

For transient transfection, 293 cells were seeded in DMEM supplemented with 5% charcoal-dextran-treated FBS, and plasmid constructs were introduced into cells using the calcium phosphate precipitation method essentially as described [34]. Typically, a mixture containing 500 ng of a reporter plasmid, 100 ng of nuclear receptor expression vector, 20-100 ng pcDNA-hGHS-R1a plasmid, and 200 ng of CMX- β gal were added per well. To activate the Akt pathway, cells were transfected with reporter and nuclear receptor plasmids, and 100 ng each of PI3K p110 α and Akt expression vectors. After 6-8 h of transfection, cells were refed with medium containing 1-100 nM ghrelin or 1.4 μ M rosiglitazone for 20 h or left untreated. For luciferase assay, cells were lysed in potassium phosphate buffer containing 1% Triton X-100, and light emission was measured using a luminometer (Wallac, Turku, Finland) after the addition of luciferin. Luciferase values were normalized for transfection efficiency to β -galactosidase activity of each sample and expressed as relative fold response compared with controls. Luciferase assays were performed in triplicates from at least three independent experiments.

Acknowledgments

We wish to thank Marilyn Resh (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) and Pascale Duplay (Institut Armand-Frappier) for providing Fyn and Dok-1 plasmids respectively.

References

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, et al. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656–660.
2. van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E (2004) Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25: 426–457.
3. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, et al. (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273: 974–977.
4. Chen C, Wu D, Clarke IJ (1996) Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs. *J Endocrinol* 148: 381–386.
5. Katugampola SD, Pallikaros Z, Davenport AP (2001) [125I-His(9)]-ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue: up-regulation of receptors with atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 134: 143–149.
6. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, et al. (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2988.
7. Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, et al. (2002) Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 159: 1029–1037.
8. Garcia EA, Korbonits M (2006) Ghrelin and cardiovascular health. *Curr Opin Pharmacol* 6: 142–147
9. Shimizu Y, Nagaya N, Teranishi Y, Imazu M, Yamamoto H, et al. (2003) Ghrelin improves endothelial dysfunction through growth hormone-independent mechanisms in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 830–835
10. Chorny A, Anderson P, Gonzalez-Rey E, Delgado M (2008) Ghrelin protects against experimental sepsis by inhibiting high-mobility group box 1 release and by killing bacteria. *J Immunol* 180: 8369–8377.

11. Iantorno M, Chen H, Kim JA, Tesauro M, Lauro D, et al. (2007) Ghrelin has novel vascular actions that mimic PI 3-kinase-dependent actions of insulin to stimulate production of NO from endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E756–E764.
12. Li WG, Gavrilu D, Liu X, Wang L, Gunnlaugsson S, et al. (2004) Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation* 109: 2221–2226
13. Li A, Cheng G, Zhu GH, Tarnawski AS (2007) Ghrelin stimulates angiogenesis in human microvascular endothelial cells: Implications beyond GH release. *Biochem Biophys Res Commun* 353: 238–243.
14. Camina JP, Lodeiro M, Ischenko O, Martini AC, Casanueva FF (2007) Stimulation by ghrelin of p42/p44 mitogen-activated protein kinase through the GHS-R1a receptor: role of G-proteins and beta-arrestins. *J Cell Physiol* 213: 187–200.
15. Rossi F, Castelli A, Bianco MJ, Bertone C, Brama M, et al. (2008) Ghrelin induces proliferation in human aortic endothelial cells via ERK1/2 and PI3K/Akt activation. *Peptides* 29: 2046–2051.
16. Xu X, Jhun BS, Ha CH, Jin ZG (2008) Molecular mechanisms of ghrelin-mediated endothelial nitric oxide synthase activation. *Endocrinology* 149: 4183–4192.
17. Filigheddu N, Gnocchi VF, Coscia M, Cappelli M, Porporato PE, et al. (2007) Ghrelin and des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of C2C12 skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell* 18: 986–994
18. Rossi F, Castelli A, Bianco MJ, Bertone C, Brama M, et al. (2009) Ghrelin inhibits contraction and proliferation of human aortic smooth muscle cells by cAMP/PKA pathway activation. *Atherosclerosis* 203: 97–104.
19. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, et al. (2001) A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 7: 161–171.

20. Ricote M, Valledor AF, Glass CK (2004) Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 230–239.
21. Castrillo A, Tontonoz P (2004) Nuclear Receptors in Macrophage Biology: At the Crossroads of Lipid Metabolism and Inflammation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 455–480
22. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, et al. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 106: 523–531.
23. Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET (2000) Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 101: 235–238.
24. Chen Z, Ishibashi S, Perrey S, Osuga J, Gotoda T, et al. (2001) Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 372–377.
25. Collins AR, Meehan WP, Kintscher U, Jackson S, Wakino S, et al. (2001) Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 365–371.
26. Avallone R, Demers A, Rodrigue-Way A, Bujold K, Harb D, et al. (2006) A Growth Hormone-Releasing Peptide that Binds Scavenger Receptor CD36 and Ghrelin Receptor Upregulates ABC Sterol Transporters and Cholesterol Efflux in Macrophages Through a PPAR γ -dependent Pathway. *Molecular Endocrinology* 20: 3165–3178.
27. Marleau S, Harb D, Bujold K, Avallone R, Iken K, et al. (2005) EP80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *FASEB J* 19: 1869–1871.

28. Feige JN, Gelman L, Rossi D, Zoete V, Metivier R, et al. (2007) The endocrine disruptor mono-ethyl-hexyl-phthalate is a selective PPAR γ modulator which promotes adipogenesis. *J Biol Chem* 282: 19152–19166.
29. Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK (1997) Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor γ is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen- activated protein kinase site. *Journal of Biological Chemistry* 272: 5128–5132
30. Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM (1996) Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ . *Science* 274: 2100–2103
31. Rozengurt E (2007) Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* 213: 589–602.
32. Nanzer AM, Khalaf S, Mozid AM, Fowkes RC, Patel MV, et al. (2004) Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Endocrinol* 151: 233–240.
33. Chung S, Lapoint K, Martinez K, Kennedy A, Boyesen SM, et al. (2006) Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes. *Endocrinology* 147: 5340–5351
34. McGarrigle D, Huang XY (2007) GPCRs signaling directly through Src-family kinases. *Sci STKE* 2007: e35. Find this article
35. Loppnow H, Werdan K, Buerke M (2008) Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine- and innate-immunity-related inflammatory mechanisms. *Innate Immun* 14: 63–87.
36. Reddy MA, Sahar S, Villeneuve LM, Lanting L, Natarajan R (2009) Role of Src tyrosine kinase in the atherogenic effects of the 12/15-lipoxygenase pathway in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 387–393

37. Bastie CC, Zong H, Xu J, Busa B, Judex S, et al. (2007) Integrative metabolic regulation of peripheral tissue fatty acid oxidation by the SRC kinase family member Fyn. *Cell Metab* 5: 371–381.
38. Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, et al. (1998) Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR- γ . *Nature (London)* 396: 377–380.
39. Carpino N, Wisniewski D, Strife A, Marshak D, Kobayashi R, et al. (1997) p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell* 88: 197–204.
40. Yamanashi Y, Baltimore D (1997) Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok. *Cell* 88: 205–211.
41. Feuillet V, Semichon M, Restouin A, Harriague J, Janzen J, et al. (2002) The distinct capacity of Fyn and Lck to phosphorylate Sam68 in T cells is essentially governed by SH3/SH2-catalytic domain linker interactions. *Oncogene* 21: 7205–7213.
42. Shinohara H, Yasuda T, Yamanashi Y (2004) Dok-1 tyrosine residues at 336 and 340 are essential for the negative regulation of Ras-Erk signalling, but dispensable for rasGAP-binding. *Genes Cells* 9: 601–607.
43. Boulay I, Nemorin JG, Duplay P (2005) Phosphotyrosine binding-mediated oligomerization of downstream of tyrosine kinase (Dok)-1 and Dok-2 is involved in CD2-induced Dok phosphorylation. *J Immunol* 175: 4483–4489.
44. Sanchez M, Sauvé K, Picard N, Tremblay A (2007) The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the PI3K/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *J Biol Chem* 282: 4830–4840.
45. Falls HD, Dayton BD, Fry DG, Ogiela CA, Schaefer VG, et al. (2006) Characterization of ghrelin receptor activity in a rat pituitary cell line RC-4B/C. *J Mol Endocrinol* 37: 51–62.

46. Wettschureck N, Moers A, Wallenwein B, Parlow AF, Maser-Gluth C, et al. (2005) Loss of Gq/11 family G proteins in the nervous system causes pituitary somatotroph hypoplasia and dwarfism in mice. *Mol Cell Biol* 25: 1942–1948.
47. Tesouro M, Schinzari F, Iantorno M, Rizza S, Melina D, et al. (2005) Ghrelin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome. *Circulation* 112: 2986–2992.
48. Camp HS, Tafuri SR (1997) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ activity by mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 272: 10811–10816.
49. Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S, et al. (1996) Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 271: 31771–31774.
50. Rangwala SM, Rhoades B, Shapiro JS, Rich AS, Kim JK, et al. (2003) Genetic modulation of PPARgamma phosphorylation regulates insulin sensitivity. *Dev Cell* 5: 657–663.
51. Sun Y, Ma YC, Huang J, Chen KY, McGarrigle DK, et al. (2005) Requirement of SRC-family tyrosine kinases in fat accumulation. *Biochemistry* 44: 14455–14462.
52. Hosooka T, Noguchi T, Kotani K, Nakamura T, Sakaue H, et al. (2008) Dok1 mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and obesity through modulation of PPAR-gamma phosphorylation. *Nat Med* 14: 188–193.
53. Barazzoni R, Bosutti A, Stebel M, Cattin MR, Roder E, et al. (2005) Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E228–E235.
54. Lodeiro M, Theodoropoulou M, Pardo M, Casanueva FF, Camina JP (2009) c-Src regulates Akt signaling in response to ghrelin via beta-arrestin signaling-independent and -dependent mechanisms. *PLoS ONE* 4: e4686.

55. Magun R, Burgering BM, Coffey PJ, Pardasani D, Lin Y, et al. (1996) Expression of a constitutively activated form of protein kinase B (c-Akt) in 3T3-L1 preadipose cells causes spontaneous differentiation. *Endocrinology* 137: 3590–3593.
56. Uto-Kondo H, Ohmori R, Kiyose C, Kishimoto Y, Saito H, et al. (2009) Tocotrienol suppresses adipocyte differentiation and Akt phosphorylation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr* 139: 51–57.
57. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W (2006) From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res* 45: 120–159.
58. Demers A, Rodrigue-Way A, Tremblay A (2008) Hexarelin Signaling to PPARgamma in Metabolic Diseases. *PPAR Res* 2008: 364784.
59. Dixit VD, Yang H, Cooper-Jenkins A, Giri BB, Patel K, et al. (2009) Reduction of T cell-derived ghrelin enhances proinflammatory cytokine expression: implications for age-associated increases in inflammation. *Blood* 113: 5202–5205.
60. Rahaman SO, Lennon DJ, Febbraio M, Podrez EA, Hazen SL, et al. (2006) A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab* 4: 211–221.
61. Muslin AJ (2008) MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci (Lond)* 115: 203–218.
62. Rodrigue-Way A, Demers A, Ong H, Tremblay A (2007) A Growth Hormone-Releasing Peptide Promotes Mitochondrial Biogenesis And A Fat Burning-like Phenotype Through Scavenger Receptor CD36 in White Adipocytes. *Endocrinology* 148: 1009–1018.
63. Sauvé K, Lepage J, Sanchez M, Heveker N, Tremblay A (2009) Positive Feedback Activation of Estrogen Receptors by the CXCL12-CXCR4 Pathway. *Cancer Res* 69: 5793–5800.

64. Demers A, McNicoll N, Febbraio M, Servant M, Marleau S, et al. (2004) Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem J* 382: 417–424.
65. Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, Licznar A, Busson M, et al. (2008) Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-AP ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 22: 317–330.
66. St Laurent V, Sanchez M, Charbonneau C, Tremblay A (2005) Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94: 23–37.

Figure legends

Figure 1. Ghrelin stimulates the PPAR γ -LXR α -ABC pathway in THP-1 macrophages

(A) RT-PCR analysis of PMA-differentiated THP-1 macrophages treated or not with 100 nM ghrelin 48 h. Representative images are shown for the indicated genes. (B) Relative mRNA expression of THP-1 cells treated with increasing doses of ghrelin for 48 h. Rosiglitazone was used as a positive control of PPAR γ activation. Data are presented as fold changes (\pm SEM) compared with undifferentiated cells, obtained from three to four separate experiments. (C) Representative immunoblot analysis of THP-1 cells treated with 10 nM ghrelin for 48 h. Relative fold changes are indicated. (D) PPAR γ is required to mediate gene activation to ghrelin. Real-time gene expression analysis in THP-1 cells treated with 10 nM ghrelin for 48 h. PPAR γ expression was silenced by infecting cells with a lentiviral-carrying shPPAR γ and compared to a negative control shRNA. Results are normalized to GAPDH expression.

Figure 2. Ghrelin induces PPAR γ activation and phosphorylation independently of serine-84.

(A) Ghrelin promotes PPAR γ activity in 293 cells transfected with a UAS β Luc reporter plasmid in the presence of GHS-R1a and Gal4 fusion of full-length PPAR γ 1 expression plasmids. Transfected cells were treated with 10 nM ghrelin or 1.4 μ M rosiglitazone for 20 h and harvested for luciferase activity. Values are normalized to β -galactosidase activity

and expressed as fold changes in luciferase activity compared with untreated cells expressing GHS-R1a. Error bars represent the mean \pm SEM of triplicate values derived from at least three independent experiments. **(B)** Similar as in (A) except that a truncated ABCD γ construct lacking the ligand binding domain, or a CDEF γ construct lacking the N-terminal region were used. **(C)** Activation of PPAR γ by ghrelin is independent of serine 84. 293 cells were transfected as in (A) with an expression vector for Gal4-PPAR γ or Gal4-PPAR γ S84A. Cells were treated with ghrelin as indicated or with 1.4 μ M rosiglitazone for 20 h. **(D)** Phosphorylation of PPAR γ in serum-deprived differentiated THP-1 cells treated with increasing doses of ghrelin for the indicated time. Cell extracts were immunoprecipitated with an antibody against PPAR γ and analyzed by immunoblot using antibodies against phospho-serine residue or phospho-specific to PPAR γ serine-84. Samples were normalized with a different anti-PPAR γ antibody.

Figure 3. The effects of ghrelin on PPAR γ are independent of the EGF receptor.

(A) Phosphorylation of Erk1/2 in differentiated THP-1 cells serum-deprived for 16 h and treated with 5 μ M of the EGFR inhibitor AG1478 for 30 min before incubation with 10 nM ghrelin for 5 and 15 min. The lysates were analyzed by immunoblot using a phospho-Erk1/2 antibody and normalized with an anti-Erk1/2 antibody. **(B)** Effect of EGFR inhibition on PPAR γ activity using 293 cells transfected with UAS γ Luc reporter along with Gal4-PPAR γ and GHS-R1a plasmids, and then treated with 10 nM ghrelin with or without 5 μ M EGFR inhibitor AG1478 for 20 h before harvested for luciferase assay. **(C)** Phosphorylation of PPAR γ in THP-1 cells treated as in (A) or with 1 μ M TNF α for 15 min.

Cell extracts were immunoprecipitated with an antibody against PPAR γ and analyzed by immunoblot with anti-phospho-serine and anti-PPAR γ pSer-84 antibodies.

Figure 4. Induced recruitment and activation of Fyn kinase to the GHS-R1a receptor by ghrelin.

(A) Ghrelin activates Src-related kinases. Differentiated THP-1 cells were serum-deprived for 16 h and incubated with 1 μ M Src-related kinase inhibitor PP2 or 10 nM PI3-K inhibitor LY-294002 for 30 min before incubation with 10 nM ghrelin for the indicated times. The lysates were then analyzed by immunoblot with an anti-phospho-specific to Src Tyr-418, the activation loop site, and loading was monitored with a β -actin antibody. **(B)** Ghrelin promotes Fyn activation in THP-1 macrophages. Cells were treated as in (A) and extracts were immunoprecipitated with an antibody against Fyn, and analyzed by immunoblot using anti-SrcpY418 and anti-Fyn antibodies. **(C)** Fyn is recruited to the GHS-R1a receptor and activated by ghrelin. THP-1 cells were treated similar as in (A) and immunoprecipitation was carried out with an antibody against GHS-R1a, and analyzed by immunoblot using anti-Src-pY418 and anti-Fyn antibodies. Samples were normalized with an anti-GHS-R1a antibody. **(D)** Effect of GHS-R1a inhibition on Fyn recruitment and activation. Serum deprived THP-1 cells were pretreated with 100 nM D-Lys3-GHRP-6 for 30 min, followed by incubation with 10 nM ghrelin for 30 min, and then analyzed as in (C).

Figure 5. The ghrelin-induced PPAR γ activation involves a negative regulation of Erk through Fyn/Dok-1 interaction.

(A) Src inhibition increases Erk1/2 activity in differentiated THP-1 cells serum-deprived for 16 h and incubated with 1 μ M PP2 for 30 min before incubation with 10 nM ghrelin for 2 to 30 min. The lysates were analyzed by immunoblot with antibodies specific to phospho-Erk1/2 and total Erk1/2. **(B)** Phosphorylation of PPAR γ Ser-84 is increased by Src inhibition in THP-1 cells. Cells were treated as in (A), and lysates were immunoprecipitated with an antibody against PPAR γ and analyzed by immunoblot using antibodies against phospho-serine, PPAR γ pSer-84, and total PPAR γ . **(C)** The PPAR γ S84A mutant is insensitive to Src inhibition. 293 cells were transfected with UAS κ Luc reporter in absence or presence of GHS-R1a, and with Gal4-PPAR γ (*left*) or Gal4-PPAR γ S84A (*right*) plasmids. Cells were then treated with 10 nM ghrelin with or without 1 μ M PP2 for 20 h, and harvested for luciferase assay. Normalized values are presented as fold changes \pm SEM compared with untreated cells in presence of GHS-R1a. **(D)** Expression of Fyn inhibits Erk1/2 activity and PPAR γ Ser-84 phosphorylation in the presence of ghrelin. 293 cells were transfected with GHS-R1a, Fyn and PPAR γ expression plasmids, and then treated with 10 nM ghrelin for 5 and 15 min. Cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. **(E)** Ghrelin promotes activation of Dok-1 and its recruitment to Fyn. 293 cells were transfected with Fyn and GHS-R1a expression plasmids in presence of Dok-1 or its inactive Y146F mutant, and treated with 10 nM ghrelin for the indicated time with or without 1 μ M PP2. Immunoprecipitation was carried out with an antibody against HA and analyzed by immunoblot using anti-Src pTyr-418, anti-Fyn, anti-phospho-tyrosine (pTyr) and anti-Dok-1 antibodies. **(F)** Ghrelin promotes the recruitment of Dok-1 to Fyn in THP-1 macrophages. Cells were treated as in (A) and the

lysates were immunoprecipitated with an antibody against Dok-1 and analyzed by immunoblot using the indicated antibodies.

Figure 6. Positive regulation of PPAR γ activity by ghrelin involves the PI3-K/Akt pathway in macrophages.

(A) Ghrelin induces the PI3-K/Akt pathway in macrophages. Serum-starved THP-1 cells were treated with 10 nM ghrelin with or without 1 μ M PP2 for the indicated times prior to Western analysis for phosphorylated Akt and PI3-K p85 subunit. **(B)** The PI3-K/Akt pathway is required to activate PPAR γ by ghrelin. 293 cells were transfected with a PPREtkLuc reporter and expression vectors encoding PPAR γ and GHS-R1a, and then treated with 10 nM ghrelin with or without 5 nM LY294002 inhibitor for 20 h. Normalized values are presented as fold changes \pm SEM compared with untreated cells. **(C)** PPAR γ phosphorylation in THP-1 cells treated as in (A). Immunoprecipitation was carried out with a PPAR γ antibody and then analyzed by immunoblot using anti-phospho-serine and anti-PPAR γ pSer-84 antibodies. **(D)** Akt promotes PPAR γ activity independently of Ser-84. 293 cells were transfected with a UAStkLuc reporter and expression vector encoding PPAR γ 1 or the S84A mutant, in presence or absence of GHSR1a. Cells were also transfected with plasmids for Akt or its kinase dead K179M (KD) mutant form in presence of constitutively active p110 α subunit of PI3-K as indicated. Cells were then treated with 10 nM ghrelin or left untreated for 20 h. Normalized luciferase values are expressed as fold changes compared with untreated cells transfected with PPAR γ . **(E)** Ghrelin induces recruitment of Akt to PPAR γ . 293 cells were transfected with GHS-R1a and HA-Akt encoding plasmids

with either PPAR γ 2 or PPAR γ 2 S112A constructs. Immunoprecipitation was carried out with a PPAR γ antibody and Western blot with anti-HA and anti-PPAR γ antibodies. **(F)** Protein G α q subunit is required in Akt activation by ghrelin in macrophages. THP-1 cells were treated as in (A) in presence or absence of 6 μ M GP antagonist-2A. Cells were analyzed by Western blot for activated Akt. **(G)** PPAR γ activation by ghrelin is dependent on G α q as determined by luciferase assay performed as in (B) in the presence or absence of 6 μ M GP antagonist-2A.

Figure 7. Activation of the PPAR γ -LXR α -ABC transcriptional cascade by ghrelin is dependent on the PI3-K/Akt pathway.

(A) Role of the PI3-K pathway on gene expression analysis from THP-1 cells treated with 100 nM ghrelin and 5 nM LY294002 for 48 h. Representative images and fold changes of mRNA expression are shown for the indicated genes. **(B)** Immunoblot analysis of THP-1 cells treated with ghrelin in presence or absence of 5 nM LY294002 for 48 h. Fold changes are shown relative to untreated cells. **(C)** A proposed model for the GHS-1a-induced signaling to PPAR γ in macrophages. Activation of GHS-R1a by ghrelin promotes the recruitment and activation of a Fyn/Dok-1 complex with the subsequent decrease in Erk1/2-mediated phosphorylation of PPAR γ Ser-84, restraining its inhibitory potential. Ghrelin also activates the PI3-K/Akt pathway through a G α q-dependent mechanism, which then promotes PPAR γ AF-1 phosphorylation independently of Ser-84, resulting in receptor transcriptional activation and increase in the PPAR γ -LXR α -ABCA1/G1 metabolic cascade in macrophages.

Figures

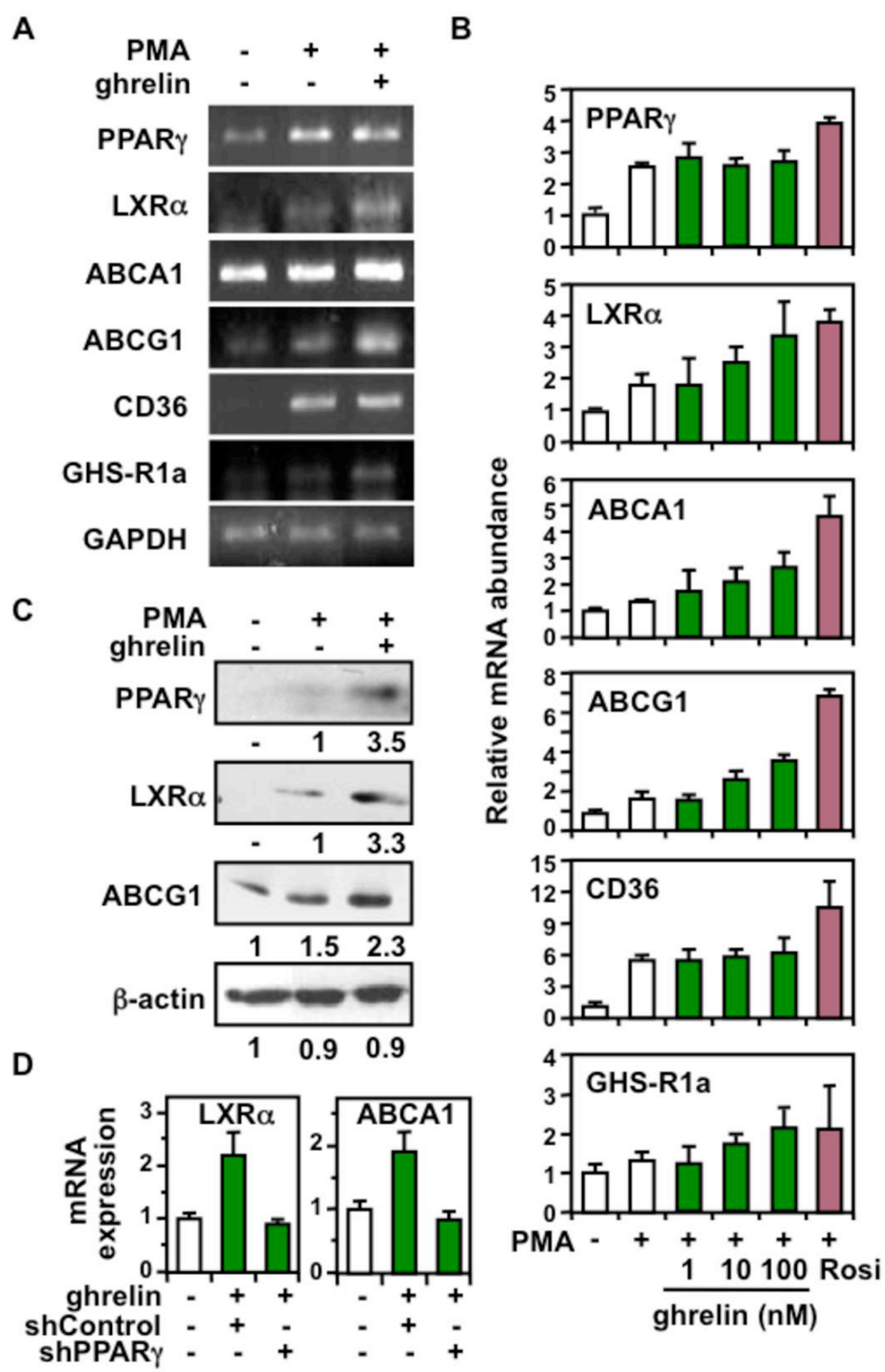


Fig. 1

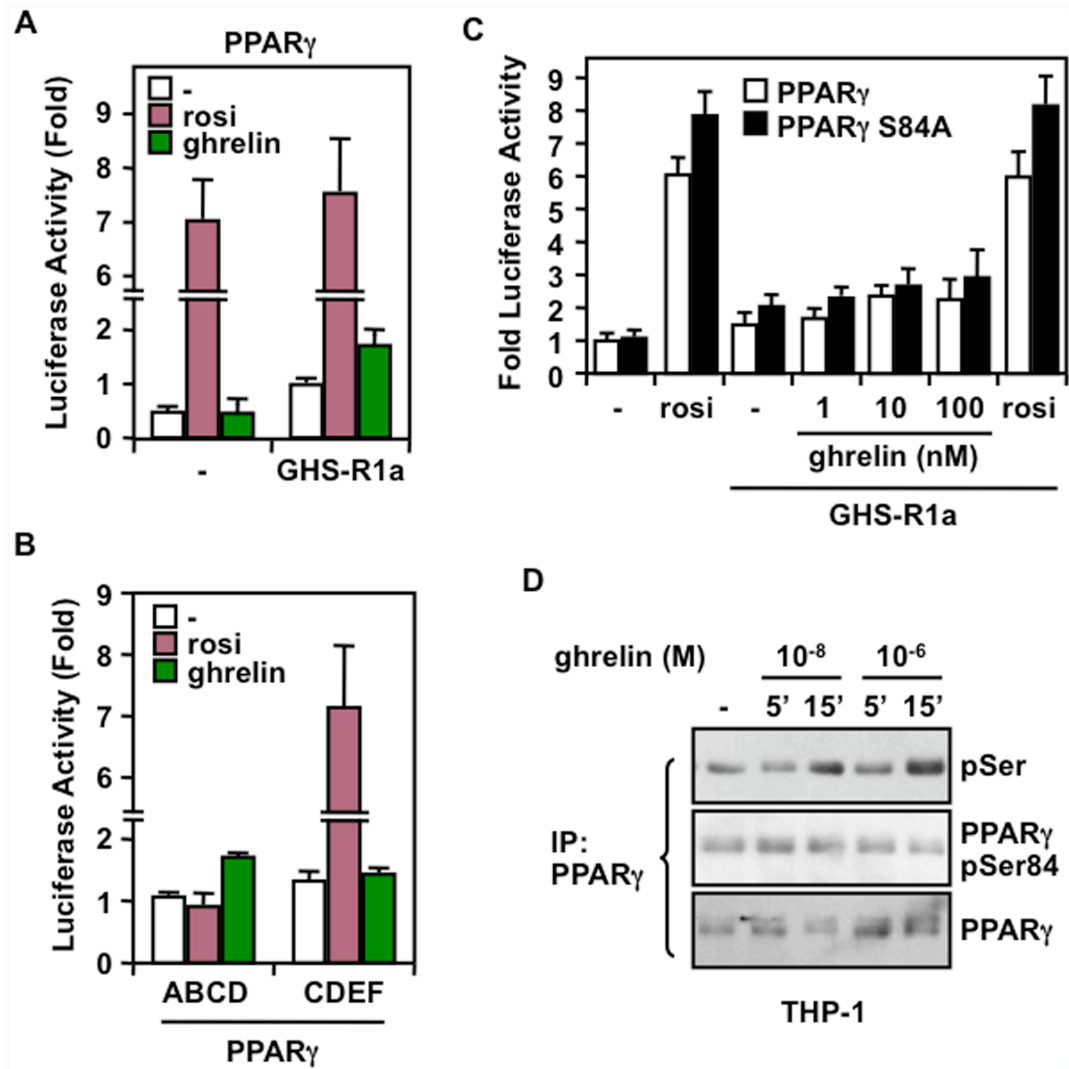


Fig. 2

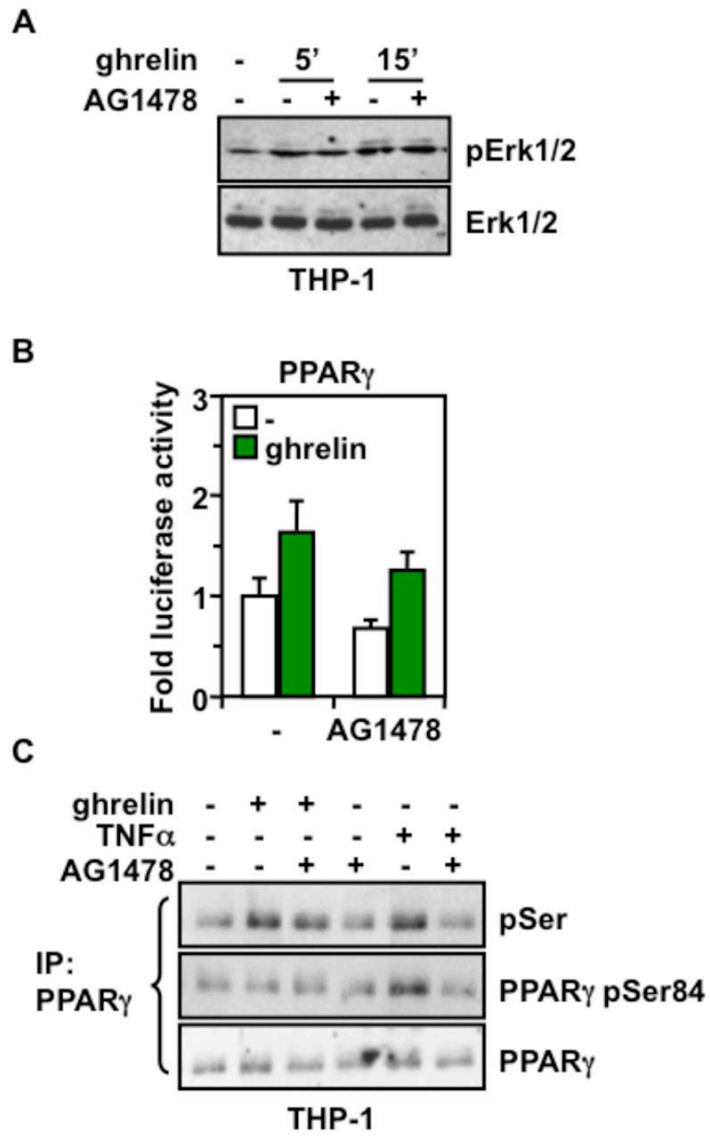


Fig. 3

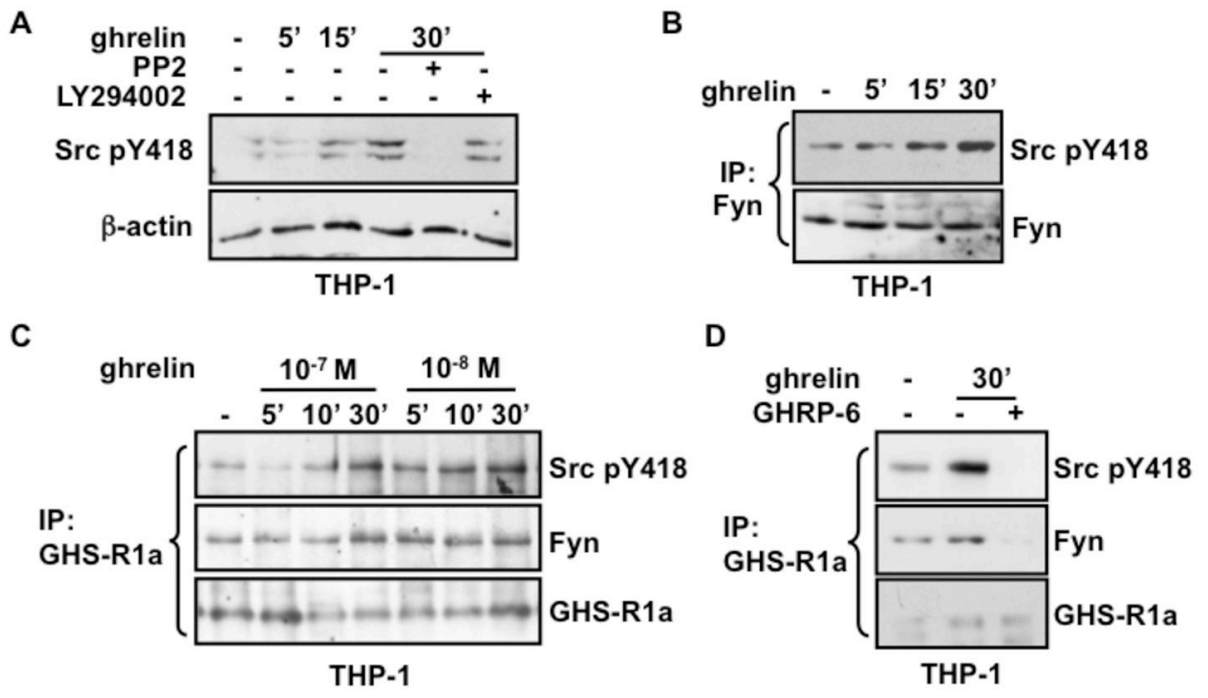


Fig. 4

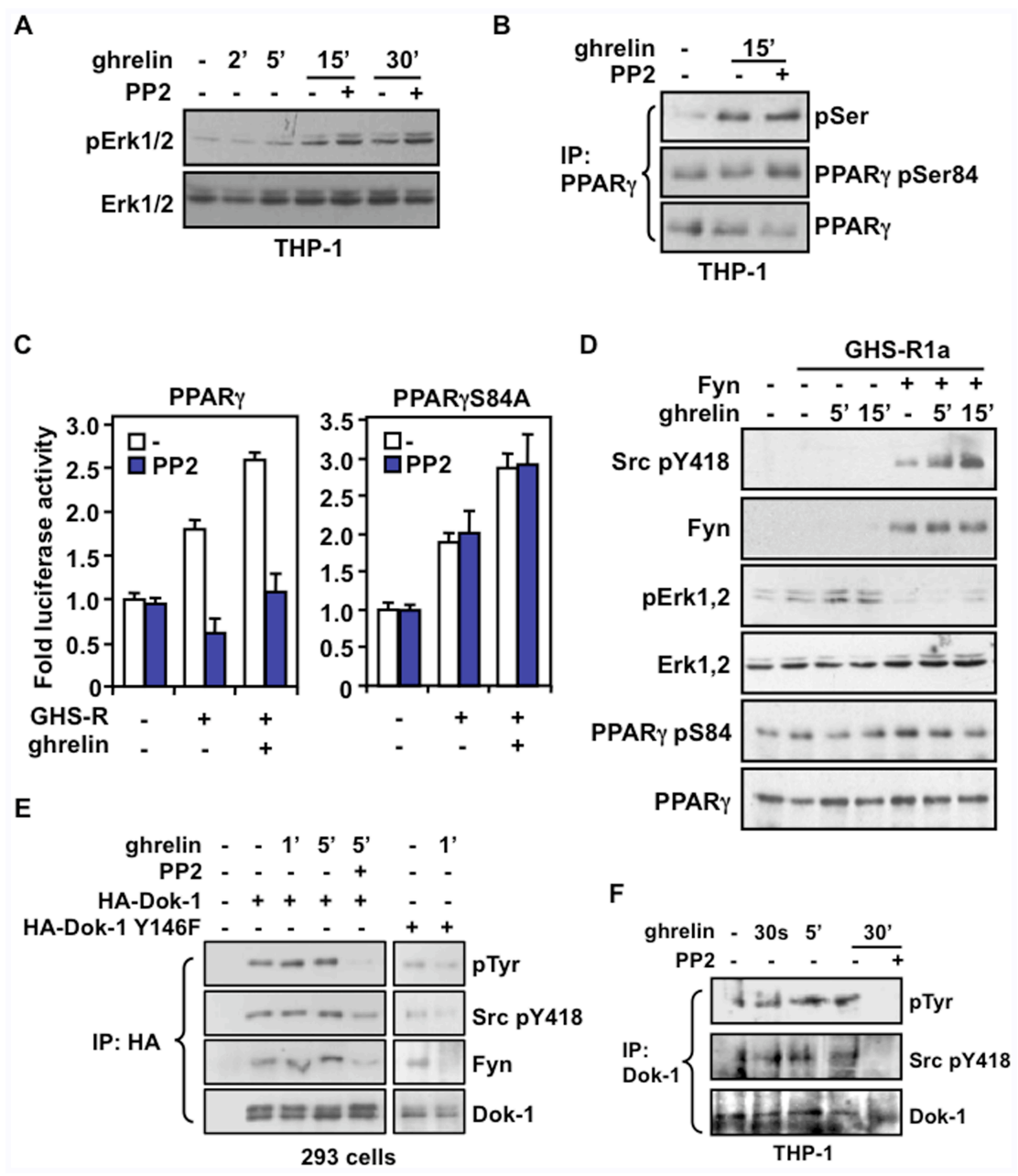


Fig. 5

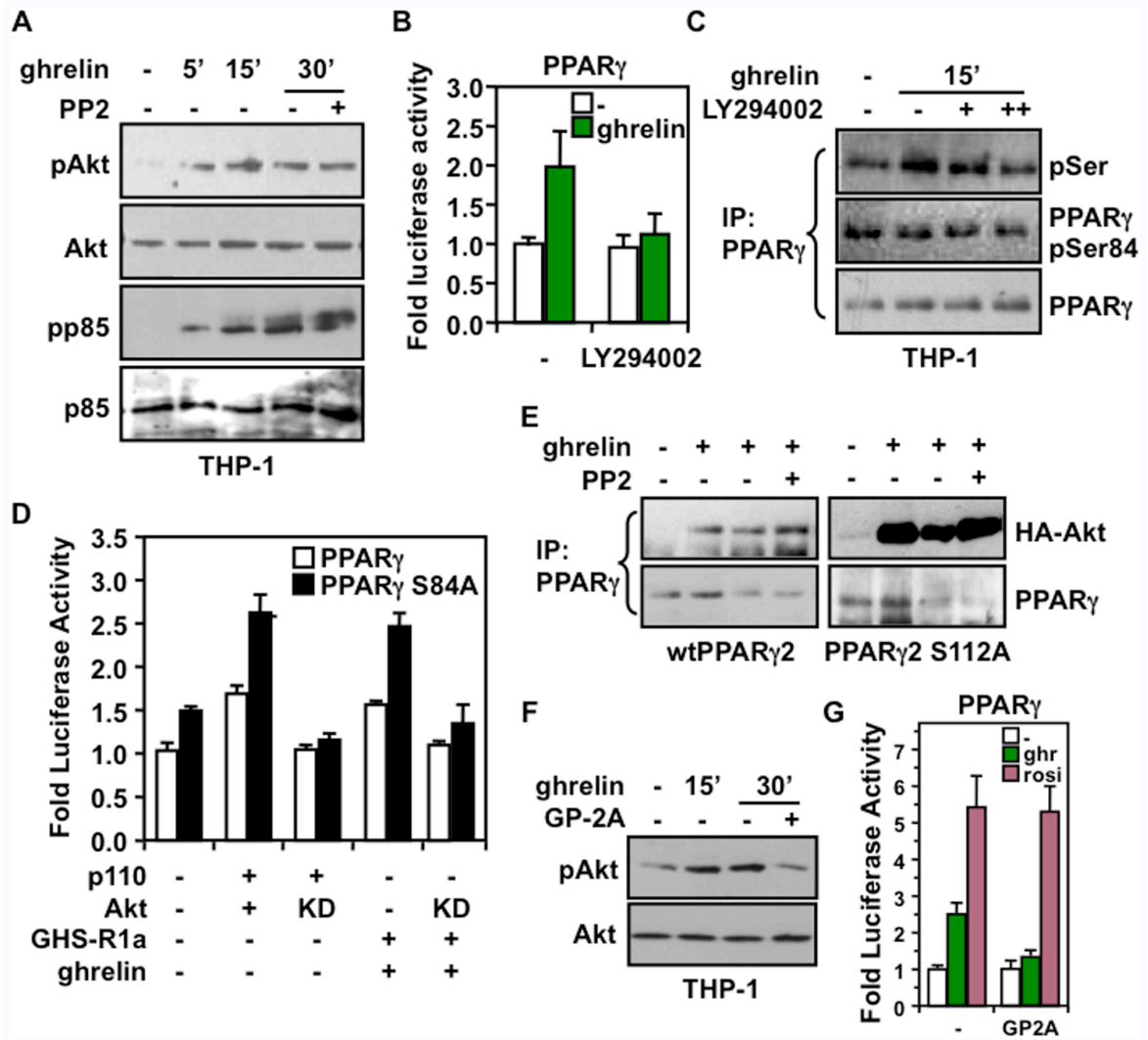


Fig. 6

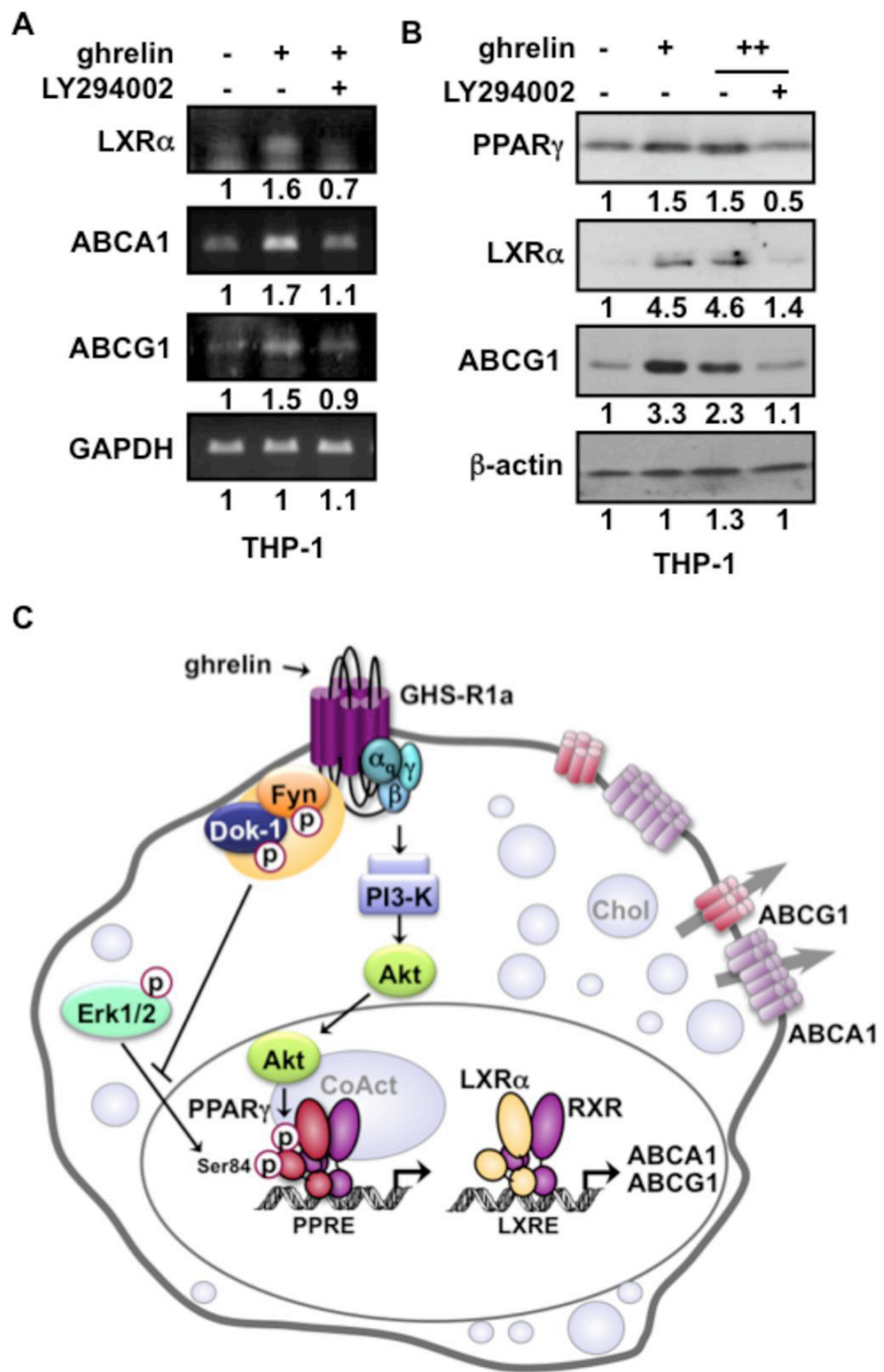


Fig. 7

**Chapitre 7, 8 et 9 : Discussion générale, perspectives
et conclusions**

7 Processus impliqués dans le contrôle du métabolisme lipidique du macrophage par l'activation des récepteurs CD36 et GHS-R1a

Une des contributions principales de cette thèse est l'accent qu'elle met sur la compréhension des mécanismes impliqués dans la modulation du métabolisme lipidique du macrophage et sur la détermination de l'influence de ces mécanismes sur le développement des lésions athérosclérotiques. Le premier objectif était de mesurer le potentiel anti-athérosclérotique du GHRP hexaréline. Cette question est déterminante puisque advenant un effet anti-athérosclérotique *in vivo*, l'intérêt de comprendre les mécanismes devient alors crucial. Les travaux présentés dans cette thèse suggèrent que l'activation de la cascade PPAR γ -LXR α -transporteurs ABC et l'augmentation du transport inverse du cholestérol sont déterminantes dans l'effet bénéfique de l'hexaréline. L'implication majeure de cette conclusion est l'apport d'une nouvelle approche pharmacologique dans le traitement de l'athérosclérose. Un autre objectif de cette thèse était de mieux comprendre les mécanismes de signalisation du récepteur de la ghréline impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ . Bien que de nombreux mécanismes de signalisation du récepteur de la ghréline soient connus depuis plusieurs années, leur implication dans la biologie du macrophage est restée mal caractérisée jusqu'à maintenant. Cette question a été abordée par des approches de biologie moléculaire et cellulaire. Les travaux présentés ici démontrent de nouvelles voies de signalisation agissant de façon concomitante dans la

régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ ayant le potentiel d'influencer l'homéostasie lipidique du macrophage.

7.1 L'hexaréline protège les souris du développement des lésions athérosclérotiques

Lors de la première étude, nous avons utilisé le modèle de souris apoE^{-/-} soumises à une diète riche en cholestérol et en lipide (HFHC) pour recréer un environnement athérogène facilitant l'étude de la régulation du processus athérosclérotique. L'apoE est un transporteur de cholestérol qui permet la prise en charge du cholestérol par le foie et le tissu adipeux (Mahley 1988). Sa délétion contribue à l'accumulation des VLDL (lipoprotéines de très faible densité) et des chylomicrons plasmatiques et à l'accumulation des cellules spumeuses dans la paroi de l'artère (Pendse et al. 2009). Le développement et la composition des plaques des souris apoE^{-/-} sous une diète HFHC sont similaires à ceux observés chez l'humain (Pendse et al. 2009). L'utilisation de ce modèle animal nous paraissait donc un choix judicieux devant l'intention d'évaluer l'implication physiologique d'un traitement quotidien à moyen terme avec l'hexaréline (100 μ g/kg, pendant 12 semaines). Dans le premier article, nous montrons que l'hexaréline réduit significativement l'aire des lésions athérosclérotiques dans le tronc aortique des animaux et il apparaît donc un rôle anti-athérosclérotique à l'activation des récepteurs CD36 et GHS-R1a.

7.2 Le transport inverse du cholestérol par la cascade PPAR γ -LXR α -transporteurs ABC

Une des étapes cruciales de l'athérogenèse est l'infiltration des monocytes dans l'espace sous-endothélial de l'artère, où ils se différencient en macrophages. Le macrophage joue un rôle délétère important dans les différentes étapes de l'athérosclérose d'abord par sa transformation en cellule spumeuse qui résulte d'une sur-accumulation de lipides intracellulaires et ensuite par sa production de cytokines inflammatoires et de métalloprotéinases. Devant l'importance de ce type cellulaire comme initiateur du développement des plaques athérosclérotiques, nous avons appliqué l'ensemble des études de cette thèse au modèle du macrophage. Le déterminant majeur du développement des cellules spumeuses est la quantité de cholestérol intracellulaire contenu par macrophages qui reflète l'équilibre entre l'influx par les récepteurs des lipoprotéines et la synthèse et l'efflux du cholestérol vers les particules de transport. Les différentes composantes participant de cet équilibre sont illustrées dans la Figure 24 (p. 205).

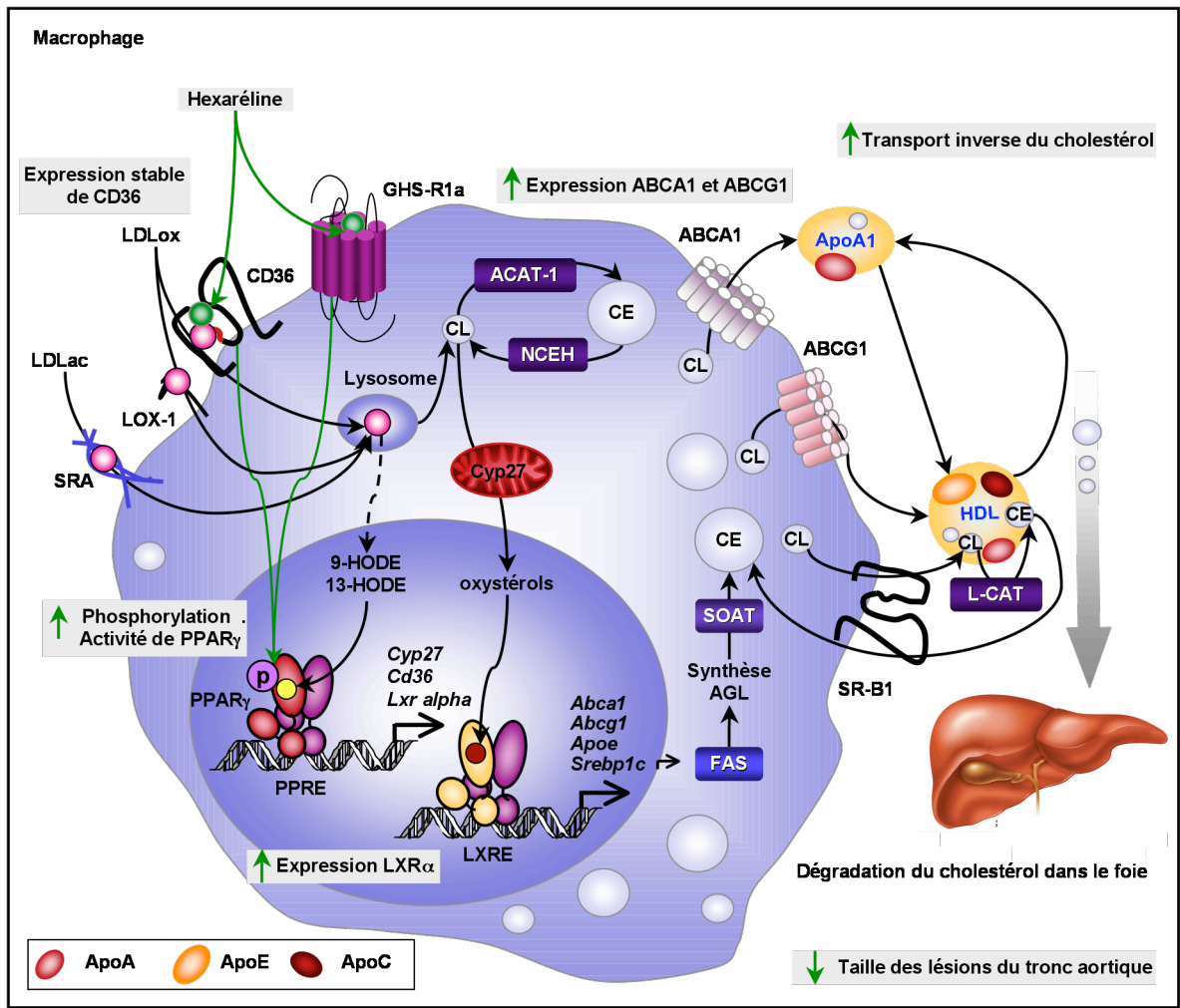


Figure 24 : La régulation du métabolisme lipidique du macrophage.

L'internalisation du cholestérol (provenant des LDLac ou des LDLox) se fait par l'intermédiaire des récepteurs scavengers SRA, CD36 et LOX-1. Les lipoprotéines sont livrées aux lysosomes où elles seront hydrolysées en cholestérol libre (CL) par l'hydrolase neutre des esters de cholestérol (NCEH). Le cholestérol intracellulaire libre en excès est réestérifié en esters de cholestérol (CE) et mis en réserve grâce à l'ACAT-1 (acyl-coA :cholestérol acyltransférase), qui participe ainsi à la formation des cellules spumeuses.

L'accumulation en excès d'esters de cholestérol est empêchée par des mécanismes de rétrocontrôle : l'excès de cholestérol inhibe la synthèse d'acides gras libres par l'inhibition de SREBP1c. Le transport inverse du cholestérol intervient également pour limiter l'accumulation lipidique du macrophage. L'internalisation des LDLox fournit des ligands endogènes activateurs de PPAR γ , 9-HODE et 13-HODE, qui induit l'expression de LXR α (Nagy et al. 1998). Le cholestérol libre peut être converti en 27-hydroxycholestérol par l'enzyme mitochondriale Cyp27, un oxystérol activateur du récepteur LXR α (Szanto et al. 2004). L'activation de LXR α induit l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1, qui couplent l'hydrolyse de l'ATP au processus de transport unilatéral du cholestérol vers les accepteurs ApoA1 et HDL respectivement (Costet et al. 2000; Kennedy et al. 2001). LXR α promouvoit aussi la transcription des apolipoprotéines apoE et apoC qui agissent comme accepteurs de cholestérol (Laffitte et al. 2001; Mak et al. 2002). SR-B1 peut également transférer le cholestérol vers les HDL, mais son rôle dans l'homéostasie du cholestérol du macrophage est mineur chez la souris (Adorni et al. 2007). Le cholestérol libre des particules de HDL sera réestérifié par la lécithine:cholestérol acyltransférase (LCAT), les CEs seront captés par les récepteurs SR-BI du foie, puis transformés en sels biliaires ou directement excrétés dans la bile (Tailleux et al. 2002). Tout mécanisme qui intervient sur l'équilibre entre l'influx et l'efflux du cholestérol se répercutera sur le contenu lipidique du macrophage et sur sa transformation en cellule spumeuse.

Les travaux présentés dans le premier article de cette thèse indiquent que l'activation des récepteurs CD36 et GHS-R1a par l'hexaréline (Figure 24, p.205), réduit le contenu

lipidique du macrophage en favorisant le transport inverse du cholestérol par l'activation de la cascade PPAR γ -LXR α -transporteurs ABC. L'utilisation de l'inhibiteur de PPAR γ GW9662 et de souris transgéniques hétérozygotes PPAR γ -/+ montrent un rôle central de PPAR γ dans l'augmentation d'expression de LXR α et des transporteurs ABC suite au traitement à l'hexaréline des macrophages THP-1 et péritonéaux.

7.3 Avantages et inconvénients du traitement à l'hexaréline

Des agonistes de LXR α , comme le T0901317, ont montré un effet préventif sur la progression de l'athérosclérose lors d'études cliniques (Naoki et al. 2003; Petri and Markku 2003). Toutefois, une vigilance particulière est nécessaire car ces agonistes entraînent une augmentation des triglycérides hépatiques et circulants par l'augmentation d'expression de SREBP-1c, de la synthase des acides gras (FAS) et de la lipoprotéine lipase (LPL), qui stimulent respectivement la synthèse et l'internalisation des acides gras libres (Grefhorst et al. 2002; Peng et al. 2008). À l'opposé, les niveaux plasmatiques en triglycérides des animaux traités à long terme avec l'hexaréline demeurent inchangés. De plus, l'activation de PPAR γ par ses ligands synthétiques produit une forte augmentation de l'expression du CD36 qui engendre une boucle d'activation positive entre PPAR γ et CD36 favorisant l'accumulation lipidique dans le macrophage (Nicholson et al. 2000). À l'inverse, ni la ghréline ni l'hexaréline ne favorise cette boucle autorégulatrice. Ces deux observations pourraient présenter un avantage majeur en faveur de l'activation des récepteurs CD36 et le GHS-R1a dans la régulation du métabolisme lipidique du macrophage.

L'utilisation de l'hexaréline présente le désavantage d'activer simultanément les récepteurs CD36 et GHS-R1a, ce qui rend difficile l'interprétation de la contribution individuelle de chacun des récepteurs. À l'appui du rôle anti-athérosclérotique de la liaison des GHRPs sur le CD36, des études animales de notre laboratoire ont précédemment montré que l'administration à long terme (12 semaines) de EP80317, un ligand exclusif de CD36, aux souris apoE^{-/-} soumise à la diète HFHC réduit la formation des lésions athérosclérotiques (Marleau et al. 2005). Aussi, pour améliorer la connaissance du rôle de chacun des récepteurs dans l'effet de l'hexaréline, nous aurions pu utiliser un modèle de souris avec délétion sur le gène *Ghs-r1a* et/ou *Cd36* afin de déterminer la contribution précise de chacun des récepteurs dans leur modulation de l'effet anti-athérosclérotique.

7.3.1 L'inhibition de la boucle auto-régulatrice entre PPAR γ et CD36

Nous avons montré que l'activation de PPAR γ par la ghréline et l'hexaréline ne stimule pas une augmentation d'expression du CD36 dans le macrophage, alors que l'expression d'autres gènes cibles de PPAR γ , comme LXR α , est augmentée. À cet effet, nous observons une occupation préférentielle du promoteur de LXR α par opposition au promoteur du CD36 dans les THP-1 traitées à l'hexaréline. Le mécanisme exact de cette activation sélective des gènes n'a pas été clairement établi, mais il est probable que les signaux intracellulaires induits par la ghréline et l'hexaréline soient impliqués.

Il faut premièrement noter que l'élément de réponse de LXR α est un PPRE très semblable au consensus traditionnel (TGAACTxTGACT). À l'opposé, le gène *Cd36* possède plutôt

2 éléments de réponse atypiques, répondant aux ligands de PPAR, répartis sur les promoteurs les plus en amont et en aval (Sato et al. 2007) du gène, qui est composé d'un total de 3 régions promotrices (Andersen et al. 2006). Également, le promoteur *Cd36* contient des éléments de réponse pour le facteur induit par l'hypoxie HIF-1 et pour C/EBP (Kwapiszewska et al. 2005; Qiao et al. 2008) et il a été démontré que la signalisation par Akt peut influencer l'activité de ces facteurs de transcription (Ito et al. 2009; Mwaikambo et al. 2009) et donc l'expression du CD36.

Dans un second ordre d'idées, les effets physiologiques divergents de certains ligands de PPAR γ sur la différenciation adipocytaire sont attribués à un recrutement différentiel de cofacteurs (Fukui et al. 2000; Rocchi et al. 2001). Il est également clairement établi que le statut de phosphorylation des nombreux récepteurs nucléaires peut restreindre le répertoire d'expression de gènes cibles par un mécanisme semblable (Faus and Haendler 2006; Shen et al. 2009; Torra et al. 2008). Il serait donc envisageable que la phosphorylation de PPAR γ induite par l'hexaréline et la ghréline ait un effet restrictif sur l'expression de certains gènes cibles de PPAR γ , dont le CD36, par un recrutement différentiel de cofacteurs. Dans l'ensemble, les mécanismes moléculaires régulant l'expression du CD36 apparaissent curieusement complexes et l'élucidation des mécanismes qui sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle du CD36 suite à l'activation du GHS-R1a et du CD36 mériterait une attention particulière.

7.3.2 L'interaction particulière entre l'hexaréline et le CD36

La transduction du signal de l'hexaréline résulte en l'activation des deux récepteurs transmembranaires CD36 et GHS-R1a. Cependant la fonction physiologique de la partie du récepteur exposée à l'environnement extérieur est unique au CD36 par sa propriété multiligand-multifonctionnel. Il a été démontré que l'inhibition de la liaison et de l'internalisation des LDLox par des nanoparticules polymériques module l'accumulation de cholestérol intracellulaire et réduit la formation des cellules spumeuses. Une autre approche par l'utilisation des protéines chimériques CD36-Immunoglobines (CD36-Ig) solubles par les cellules pour compétitionner avec le CD36 membranaire dans la liaison des LDLox a été proposée par l'équipe du Dr Nagarajan (Stewart and Nagarajan 2006). En ce sens, une fraction du potentiel anti-athérosclérotique de l'interaction hexaréline-CD36 proviendrait de l'inhibition de l'internalisation des LDLox par le CD36 exprimé à la surface des macrophages. Dans les modèles d'inhibition de l'interaction CD36 membranaire –LDLox décrits ci-dessus, l'impact de l'inhibition du CD36 sur la liaison des autres ligands physiologiques n'a pas été démontré. Nous avons précédemment montré que l'interaction CD36-LDLox est spécifiquement inhibée par l'hexaréline tandis que celle d'autres ligands comme la thrombospondine n'est pas affectée. Cette observation apporte une spécificité remarquable à notre approche (Demers et al. 2004). À l'appui, l'équipe du Dr Podrez a récemment identifié deux lysines : K164 et K166, dont les charges positives sont essentielles à la reconnaissance des LDLox par le CD36 (Kar et al. 2008). Ces deux résidus sont très rapprochés du site M169 impliqué dans la liaison de l'hexaréline sur le CD36

(Demers et al. 2004) et renforcent notre observation que l'inhibition spécifique de la liaison des LDLox par l'hexaréline est une des composantes de l'effet anti-athérosclérotique de l'hexaréline.

7.4 Particularités de la régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ par CD36 et GHS-R1a

Le développement des connaissances relatives à la signalisation cellulaire a mis en évidence la complexité des phénomènes de transfert d'information intracellulaire. Le cas des GPCRs illustre parfaitement cette évolution. Le modèle décrivant l'interaction d'un récepteur fidèlement couplé à une protéine G hétérotrimérique et par son intermédiaire à un effecteur spécifique, a été transformé en un schéma bien plus diversifié et le récepteur de la ghréline n'y fait pas exception. Les travaux présentés dans cette thèse ont contribué à une meilleure caractérisation des voies de signalisation convergent vers la régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ par le récepteur de la ghréline dans le macrophage par: (1) l'activation de la cascade G α q/PI3-K/Akt et (2) l'implication de la voie Fyn/Dok-1/ERK1/2.

Lors du développement des lésions athérosclérotiques, la kinase Akt a un effet mitogénique et inhibiteur de l'apoptose en réponse aux LDLox (Figure 26, p. 223) (Boullier et al. 2006). L'effet anti-apoptotique de Akt est la fois bénéfique et délétère dépendamment de la phase de développement des lésions. Lors de la phase initiale, le prolongement de la survie des macrophages contribue à augmenter la formation des lésions puisque s'ils entraînent en

apoptose, les macrophages seraient phagocytés et enlevés de la plaque (Bente et al. 2008). Cependant, dans les lésions avancées, la complexité de la plaque empêche la phagocytose efficace des macrophages apoptotiques, qui s'intègrent dans le cœur nécrotique de la plaque et contribuent à son instabilité (Fan and Watanabe 2003). Également, PI3-K/Akt est impliquée dans la génération de stress oxydatif en augmentant l'expression de la iNOS, qui génère des ions superoxydes et des espèces azotés réactives (RNSs) (Kim et al. 2006a). Les RNSs ont un effet apoptotique et contribuent à l'instabilité de la plaque et éventuellement à sa rupture (Elahi et al. 2007). De ce fait, l'activation de Akt par la ghréline pourrait être bénéfique dans les lésions complexes, mais il est extrêmement difficile de spéculer puisque Akt semble exercer à la fois des effets pro- et anti-apoptotiques.

7.4.1 L'activation de PPAR γ par la ghréline est dépendante de Akt

L'observation que l'inhibiteur de PI3-K LY294002 est capable de bloquer la phosphorylation et l'activation de PPAR γ a permis de tester l'hypothèse d'un rôle important de Akt dans la régulation des gènes cibles de PPAR γ dans le macrophage ((1) Figure 25, p.215). Effectivement, l'inhibition de PI3-K empêche l'induction d'expression de la cascade PPAR γ -LXR α -transporteurs ABC par la ghréline. Jusqu'à présent, des mécanismes agissant sur la régulation de l'expression de l'ARNm de PPAR γ par la voie PI3-K ont été décrits, exposant PI3-K/Akt comme essentielle à l'adipogenèse (Yoshiga et al. 2007; Yu et al. 2008). Notre modèle d'activation est plutôt indépendant d'une augmentation de la transcription de PPAR γ quoiqu'il est possible qu'une stabilisation de

PPAR γ soit induite puisque les niveaux protéiques de PPAR γ sont augmentés. Afin de tester cette hypothèse il serait nécessaire de montrer par des expériences de pulse-chase si la stabilité de PPAR γ est accrue en présence de ghréline. Dans l'affirmative, il serait intéressant de vérifier l'implication de l'ubiquitination de PPAR γ , puisque l'AF-1 et le LBD de PPAR γ sont dégradés différemment via le protéasome par des mécanismes indépendant et dépendant de l'ubiquitination respectivement (Genini and Catapano 2006; Kilroy et al. 2009).

7.4.2 La phosphorylation de PPAR γ

Les données présentées dans les deux publications révèlent une augmentation, non spécifique à la S84, de la phosphorylation des sérines de PPAR γ lors du traitement des THP-1 avec la ghréline et l'hexaréline. Le ou les sites exacts de phosphorylation n'ont pas été identifiés pour l'instant. Afin de répondre adéquatement à cette question, il serait utile de cartographier précisément les sites de PPAR γ phosphorylés suite à l'activation du GHS-R1a et du CD36 par spectrométrie de masse en mode tandem en couplage avec une chromatographie liquide (LC-MS/MS). L'approche repose sur une première immunoprécipitation de PPAR γ (transfecté dans les 293T ou extrait des THP-1) suivie d'une digestion protéolytique, avec enrichissement des phosphopeptides par chromatographie d'affinité métal-phosphate (IMAC), et séquençage par la LC-MS/MS (Kunin et al. 2008; Tsay et al. 2000). Il est évident que ces travaux devront être complétés

par des études visant à tester l'implication des différents sites identifiés dans l'induction des gènes cibles de PPAR γ .

Le potentiel activateur de Akt sur PPAR γ requiert probablement d'autres intermédiaires puisque aucun site consensus RXRXXT/S de Akt n'est présent sur PPAR γ . Une liste exhaustive de corégulateurs capables de lier directement le facteur de transcription et de réguler de façon positive ou négative la transcription de ses gènes cibles a été décrite (Tsuchida et al. 2005; Yu and Reddy 2007). Les cibles potentielles au niveau du macrophage sont SRC-1 (Yu et al. 2007; Zhu Y 1996) et -3 (Yu et al. 2007), PPAR γ -coactivator-1(PGC-1) - α et - β (Puigserver and Spiegelman 2003), et CREB-binding protein (CBP)/p300 (Gelman et al. 1999). De façon intéressante, notre équipe a décrit que la cotransfection du coactivateur CBP en présence de Akt dans un modèle de 293T augmente considérablement l'activité transcriptionnelle de PPAR γ en réponse au ligand Troglitazone (Sanchez et al. 2007), ce qui pourrait impliquer que l'augmentation d'activité transcriptionnelle de PPAR γ par la ghréline est consécutive de l'action dirigée de Akt vers CBP. Une étude plus exhaustive serait nécessaire afin de déterminer le ou les corégulateurs impliqués dans la modulation de l'activité de PPAR γ par la voie PI3-K/Akt.

7.4.3 Le rôle des MAPKs dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ par la ghréline.

Selon notre modèle, le recrutement de Fyn au GHS-R1a suite à l'activation du GHS-R1a par la ghréline permet à la kinase de lier Dok-1 dans sa forme active ((2) Figure 25, p.215).

La formation de ce complexe empêche ERK1/2 de phosphoryler la S84 de PPAR γ et contribue à activer PPAR γ . Plusieurs de nos observations expérimentales nous ont orientés vers une telle conclusion : 1- la coimmunoprécipitation du GHS-R1a et de la Src kinase Fyn activée en présence de ghréline 2- l'inhibition des Src par PP2 amplifie l'activation de

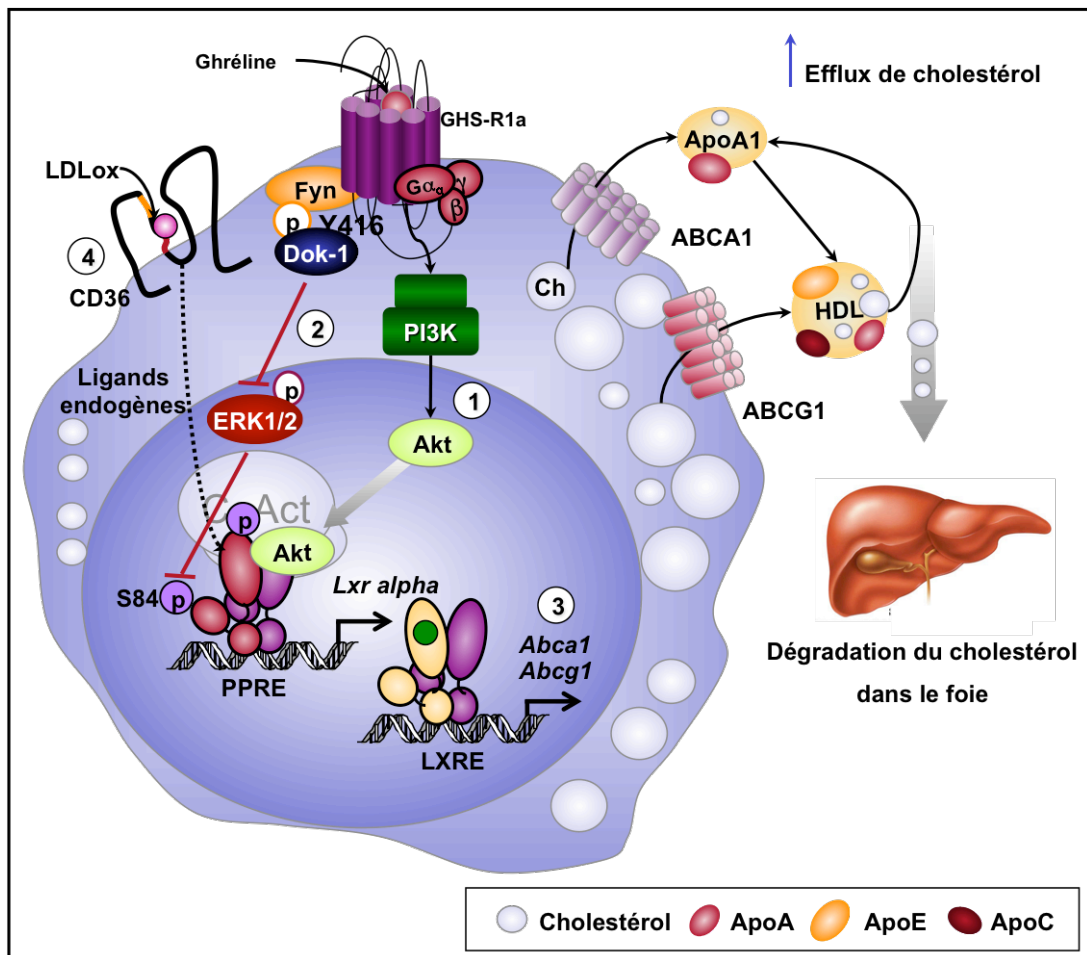


Figure 25 : La régulation de l'activité de PPAR γ par le récepteur de la ghréline

ERK1/2 par la ghréline, inhibe l'activité de PPAR γ (abolie lors de l'utilisation du mutant PPAR γ S84A) et augmente la phosphorylation de S84; 3- la surexpression de Fyn inhibe

ERK1/2 et en présence de ghréline, diminue la phosphorylation de S84 et; 4- la formation d'un complexe entre les Src activées et Dok-1 suite au traitement des THP-1 avec la ghréline.

7.4.4 Restriction de la phosphorylation de S84 par la ghréline

Les MAPKs sont importantes dans la transduction du signal des facteurs de croissance vers PPAR γ , puisqu'elles sont responsables de la phosphorylation de PPAR γ par l'insuline, le TNF- α , le TPA (12-O-Tétradécanoylphorbol-13-acétate), le PDGF ainsi que par l'EGF (Adams et al. 1997; Camp and Tafuri 1997; Hu et al. 1996; Zhang et al. 1996). La phosphorylation induite par l'EGF, le PDGF et le TPA est dépendante de MEK et a pour effet de diminuer l'activité transcriptionnelle de PPAR γ dans les modèles d'adipocytes murins et 3T3-L1 et retarde de ce fait la différenciation adipocytaire (Hu et al. 1996). Le seul site de phosphorylation des MAPKs cartographié à ce jour est la sérine 84/112 de PPAR γ 1/ γ 2 (Shao et al. 1998), qui agit comme un modulateur négatif des fonctions d'activation 1 et 2 (AF-1 et-2) de PPAR γ (Camp and Tafuri 1997).

L'activation du GHS-R1a peut impliquer plusieurs mécanismes, lors desquels interviennent notamment la PKC, la PKA, la sous-unité G α_i ou les β -arrestines. Tous ces mécanismes convergent vers l'activation de ERK1/2 (Camina et al. 2007; Kim et al. 2004; Rossi et al. 2008). Chacune de ces voies pourrait intervenir dans la résultante finale d'activation de ERK1/2 et donc sur la régulation de l'activité de PPAR γ . Cependant, cette vaste activation de ERK1/2 par la ghréline est compartimentée puisqu'il existe des mécanismes de

séquestration tardive de ERK1/2 dans le cytoplasme par les β -arrestines, qui empêchent la translocation de ERK1/2 dans le noyau (Lefkowitz 2005). À cet effet, seule la réponse précoce de ERK1/2 ciblerait le noyau. Ce mécanisme permet une activation distincte des différents rassemblements de ERK1/2 qui diffèrent dans leur organisation temporelle et spatiale et conduisent à des effets physiologiques distincts.

La somme de nos résultats pointe vers l'activation spécifique du complexe GHS-R1a/Fyn/Dok-1 ayant pour effet de restreindre l'effet activateur de la ghréline sur ERK1/2. Pour bien comprendre il faut également garder en mémoire que l'activation du GHS-R1a dans les THP-1 n'induit pas la phosphorylation de S84 de PPAR γ et que la résultante finale de la modulation de ERK1/2 se traduit donc en un effet qui annule la phosphorylation de la S84 de PPAR γ . Une des implications de ce résultat est l'identification de l'interaction Fyn/Dok-1 comme mécanisme particulier en aval du GHS-R1a permettant d'obtenir une spécificité dans la régulation d'un signal activateur vers PPAR γ .

Plusieurs de nos résultats ont été obtenus en utilisant l'inhibiteur PP2, qui inhibe l'activation non seulement de Fyn kinase, mais également des Src kinases Lck et Hck (Hanke et al. 1996). Dans le but d'obtenir une spécificité supérieure, nous pourrions utiliser des ARNs d'interférences (RNAi) dirigés sélectivement contre l'expression de la protéine Fyn afin de mesurer l'impact de l'inhibition de Fyn sur la phosphorylation de la S84 de PPAR γ , mais également sur la régulation du métabolisme lipidique du macrophage en réponse à la ghréline et l'hexaréline (Shrivastava and Srivastava 2008). Une autre option serait d'obtenir le modèle de souris invalidées pour le gène *Fyn*, qui nous permettrait

d'étudier le rôle de Fyn dans la réponse du macrophage à la ghréline et également d'étudier son implication dans les mécanismes enclenchés lors de la liaison des GHRPs au CD36.

7.5 Fyn : un intégrateur du métabolisme lipidique

En 2007, le laboratoire de Dr Pressin a démontré que Fyn est également un intégrateur métabolique de l'oxydation des acides gras dans les tissus périphériques en procédant à l'étude phénotypique de la délétion du gène *Fyn* (Bastie et al. 2007). Les souris *Fyn*^{-/-} présentent une réduction de la masse adipeuse qui est associée à une diminution de la taille des adipocytes. Cette réduction est causée par une augmentation généralisée de l'internalisation et de l'oxydation des acides gras dans le tissu adipeux et le muscle squelettique qui provient de l'augmentation de l'activité de l'AMPK et de l'inhibition de l'acétyl-CoA carboxylase. La ghréline affecte également l'activité de l'AMPK de façon spécifique au tissu cible : elle inhibe l'AMPK dans le foie et l'adipocyte (Kola et al. 2005), n'a pas d'effet sur le muscle squelettique (Barazzoni et al. 2005) et active l'AMPK dans l'hypothalamus (Andersson et al. 2004; Kohno et al. 2008). Ceci illustre la relation entre l'AMPK et les effets de la ghréline sur le statut énergétique corporel et montre que la ghréline augmente la prise de nourriture par son action sur le SNC et favorise l'accumulation des lipides en périphérie (Pusztai et al. 2008). À cet effet, ce sont plutôt des traitements antagonistes du récepteur de la ghréline qui séduisent présentement l'industrie pour un traitement contre l'obésité (Abizaid and Horvath 2008; Hutchinson et al. 2008). Il est clair cependant qu'une attention particulière devrait être accordée à nos résultats sur le métabolisme du macrophage et particulièrement à l'activation de PPAR γ puisque l'obésité

est associée à une infiltration de macrophages dans le tissu adipeux (Weisberg et al. 2003). Par ailleurs, il a été proposé qu'un changement phénotypique des macrophages infiltrés, du phénotype alternatif (produisant la cytokine anti-inflammatoire IL-10) vers le stade classique proinflammatoire, contribue au développement de l'obésité en maintenant un statut inflammatoire élevé (Hotamisligil 2006; Lumeng et al. 2007). L'activation à court terme de PPAR γ par la rosiglitazone favorise la présence de macrophage au phénotype alternatif dans le tissu adipeux et jouerait un rôle dans le remodelage de ce tissu (Odegaard et al. 2007; Stienstra et al. 2008). Le phénotype du macrophage en présence de ghréline n'a pas été étudié dans cette thèse et il serait souhaitable de vérifier l'expression des cytokines pro- et anti-inflammatoires pour leur implication dans les processus athérogène et obésogène, d'autant plus que la ghréline a été décrite comme protectrice dans plusieurs modèles de maladies inflammatoires comme l'arthrite (Granado et al. 2005), la septicémie (Chorny et al. 2008), l'inflammation hépatique (Granado et al. 2008), la maladie inflammatoire de l'intestin (Gonzalez-Rey et al. 2006), la pancréatite (Dembinski et al. 2003) et les lésions pulmonaires aiguës (Chen et al. 2008).

7.6 Coopération pour la régulation de PPAR γ

7.6.1 Coopération entre Akt et ERK1/2

Nos expériences de co-immunoprécipitation permettent de supposer que Akt interagit rapidement avec PPAR γ suite à l'activation du GHS-R1a par la ghréline et que cette interaction semble être plus importante en présence du mutant PPAR γ S112A. Cette

information laisse supposer une influence de l'état de phosphorylation de S84 par ERK1/2 dans l'activation de PPAR γ par Akt. Une possibilité est que l'inhibition de la phosphorylation de S84 stabilise PPAR γ puisqu'il a été montré que la phosphorylation de S84 par ERK1/2 favorise la dégradation de PPAR γ par le système ubiquitine-protéasome (Chang et al. 2006; Floyd and Stephens 2002). Une autre possibilité est que l'absence de phosphorylation sur Ser84/112 favorise une conformation de PPAR γ qui induit le recrutement d'un complexe de coactivateurs favorisant l'interaction PPAR γ -Akt. À l'appui, de nombreuses études ont montré que l'association de PPAR γ avec les corégulateurs est le déterminant majeur responsable de la mobilité et de l'activité de PPAR γ (Tudor et al. 2007; Yu and Reddy 2007; Zhang et al. 2006). Ceci pourrait également contribuer à expliquer l'observation que le mutant PPAR γ S84A est transcriptionnellement plus actif que PPAR γ WT en absence et en présence de ghréline.

7.6.2 L'intégration des signaux de l'AF-1 par le LBD PPAR γ

Nos résultats démontrent que l'activation des récepteurs GHS-R1a et CD36 active PPAR γ en l'absence de son LBD (PPAR γ ABCD). Une récente étude montre que le domaine A/B de PPAR γ est essentiel à l'induction d'expression par l'agoniste rosiglitazone d'un petit nombre de gènes (25 sur un total de 257 gènes régulés par PPAR γ) impliqués dans le stockage lipidique (entre autres CD36, FABP et LPL). Brièvement, l'étude montre que suite à leur introduction dans la lignée NIH-3T3, les constructions PPAR γ CDEF et PPAR γ WT occupent de façon identique les différents PPREs génomiques, mais la

construction CDEF est toutefois transcriptionnellement moins active par un recrutement diminué de l'ARN polymérase II (Bugge et al. 2009). De façon intéressante, l'activation de ce sous-ensemble de gènes cibles est dépendante du recrutement de CBP et p300 au récepteur (Bugge et al. 2009).

À la lumière de cette étude, l'intégration des messagers intracellulaires du GHS-R1a par l'AF-1 de PPAR γ pourrait permettre de réguler de façon différentielle l'expression des gènes cibles. Lors de nos essais ChIP, PPAR γ est différenciellement recruté aux PPRE des régions promotrices des gènes *Cd36* et du *Lxr alpha* en réponse à l'hexaréline. Le mécanisme de ce recrutement différentiel n'est probablement pas identique à celui décrit par Bugge puisque, lors de leur étude, les PPREs sont occupés identiquement avec un recrutement de la machinerie transcriptionnelle différent. Il serait toutefois intéressant de tester l'effet de la phosphorylation accrue de PPAR γ , par l'activation des récepteurs CD36 et GHS-R1a, sur le recrutement de la machinerie transcriptionnelle aux PPREs de différents gènes cibles comme LXR α et CD36.

Du point de vue physiologique, PPAR γ doit également intégrer l'activation de son domaine de liaison du ligand (LBD), par l'apport de ligands endogènes dérivés des acides gras, dans sa réponse transcriptionnelle (Bour et al. 2005) (Saitoh et al. 2002) (Aneskievich 2001). Il a été montré qu'il est possible d'activer PPAR γ suite à l'activation de ERK par LDLox en augmentant l'expression de la COX-2, qui produit des prostaglandines, dont le 15d-PGJ₂, un activateur de PPAR γ (illustré dans la Figure 26, p.223) (Taketa et al. 2008). En accord

avec cette hypothèse, les statines, par un mécanisme identique activeraient PPAR γ (Ye et al. 2007). Fyn est aussi impliqué dans l'induction d'expression de la COX-2 par plusieurs facteurs comme le TNF- α ou les rayons B ultraviolets (UVB) (Kang et al. 2009). Dans notre modèle, l'expression de la COX-2 de même que l'apport du 15d-PGJ₂ n'ont pas été étudiés. Toutefois, puisque l'effet de la modulation de ERK1/2 par la ghréline sur l'activité transcriptionnelle de PPAR γ est aboli en présence du mutant PPAR γ S84A, nous pouvons considérer que la voie de COX-2 n'est pas un modulateur important dans l'effet de la ghréline sur PPAR γ .

7.6.3 Le rôle de CD36 dans la transduction du signal

De nombreuses études au cours des 10 dernières années ont suggéré que CD36 activerait la voie Src-MAPK lors de l'apoptose et de l'inflammation (Moore et al. 2002). Par exemple, l'effet anti-angiogénique de CD36 dans les cellules endothéliales de la microvasculature (Jiménez et al. 2000) de même que la génération de réactions d'oxydation (oxidative bursts) par le macrophage requièrent Src et les MAPKs (Bamberger et al. 2003; Cho et al. 2005; Medeiros et al. 2004; Moore et al. 2002). De façon similaire, le macrophage nécessite l'activation de la Src kinase Lyn et de JNK pour la formation des cellules spumeuses et les cellules de la microglie utilisent Fyn et MAPK pour réguler la migration (Figure 26, p.223).

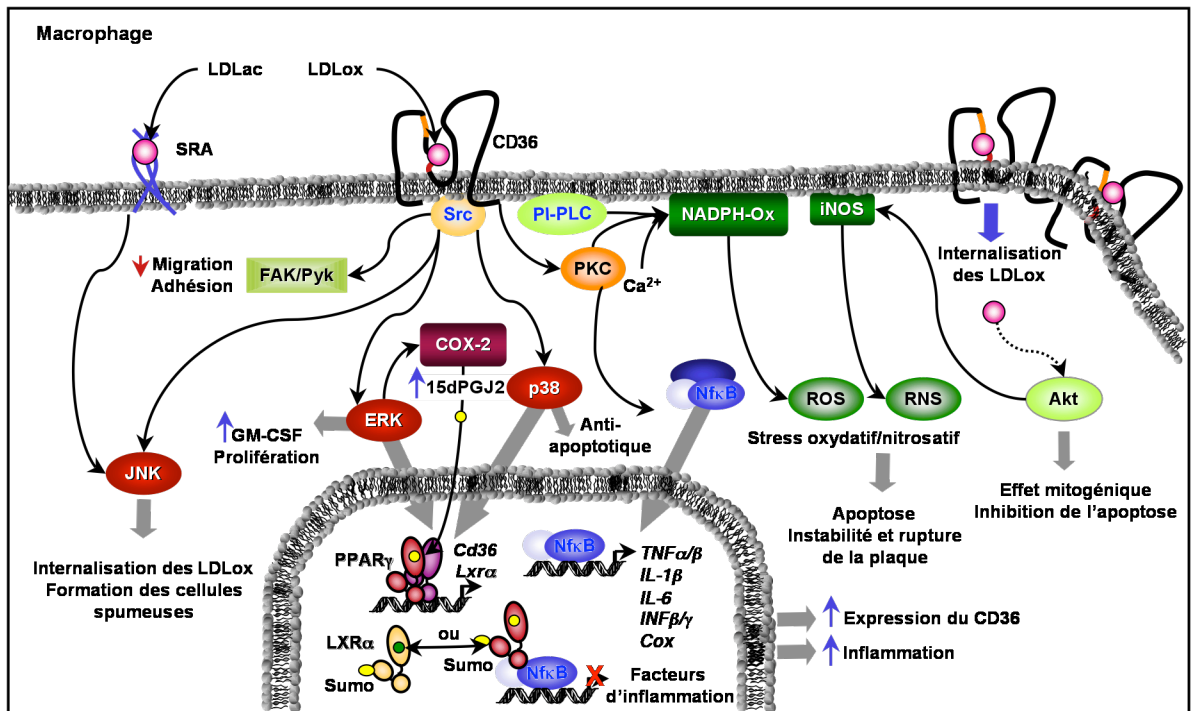


Figure 26 : Les mécanismes de signalisation athérogènes

Devant la convergence vers l'activation de Src-MAPK par le CD36 et l'implication de la voie Fyn/ERK1/2 dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ par le GHS-R1a, il serait pertinent d'initier l'identification des mécanismes de signalisation spécifiques à l'activation du CD36. Dans cette perspective, l'utilisation de l'hexaréline n'est pas idéale puisqu'elle interfère avec les mécanismes de signalisation du GHS-R1a. Cependant, l'utilisation d'un GHRP comme le EP 80317, qui lie exclusivement le CD36 ou encore une approche inhibant l'expression du GHS-R1a par siRNA serait concevable. Dans cette optique, nos collaborateurs ont récemment publié que le EP80317 réduit l'infiltration des phagocytes mononucléaires dans les lésions athérosclérotiques par un mécanisme qui implique l'activation des Src-kinases (Rahaman et al. 2006).

8 Perspectives

Les travaux de Chawla et Tontonoz (2001) ont fourni la première identification d'un mécanisme d'efflux du cholestérol au niveau du macrophage impliqué dans l'athérogenèse. Les auteurs montrent PPAR γ comme régulateur central de ce mécanisme et de nombreuses études ont par la suite confirmé l'effet bénéfique de l'activation de PPAR γ dans l'inhibition du développement des maladies cardiovasculaires. Les travaux présentés ici pourraient présenter de nouvelles voies régulatrices de l'activité de PPAR γ et du métabolisme lipidique du macrophage. Cependant, comme mentionnés auparavant, plusieurs points restent à éclaircir. Les deux plus importants sont 1- sur le plan physiologique, d'identifier la contribution spécifique du récepteur GHS-R1a dans le contrôle de l'action anti-athérosclérotique de l'hexaréline, et 2- sur l'aspect moléculaire, de caractériser les mécanismes d'interaction des cofacteurs de PPAR γ suite à l'activation du CD36 et du GHS-R1a.

8.1 Contribution du récepteur de la ghréline dans l'effet anti-athérosclérotique des GHRPs

Il serait important de confirmer si l'activation du récepteur de la ghréline résulte en un effet anti-athérosclérotique. Cette étude devra être extrêmement rigoureuse puisque la ghréline exerce de nombreux effets centraux et périphériques. À cet effet, je propose d'étudier l'effet de l'activation du GHS-R1a dans un modèle de souris présentant une expression exclusive du récepteur GHS-R1a sur les macrophages. Pour ce faire, il serait essentiel

d'utiliser des souris présentant une délétion complète du *Ghsr* auxquelles seront injectées des cellules progénitrices de la moëlle épinière de souris normales exprimant le GHS-R1a. Par la suite, l'impact d'un traitement à la ghréline sur le développement des plaques athérosclérotiques et sur le métabolisme lipidique du macrophage pourrait être mesuré *in vivo*.

8.1.1 L'interaction CD36-GHS-R1a ?

Comme nous l'avons vu au chapitre d'introduction, le récepteur GHS-R1a forme des hétérodimères avec les récepteurs de la dopamine et des prostanoïdes (Harb et al. 2009; Jiang et al. 2006). Le récepteur CD36 s'associe avec d'autres récepteurs transmembranaires comme l'intégrine $\alpha_6\beta_1$, le récepteur scavenger A et le TLR2 (Bamberger et al. 2003; Chow et al. 2008; Kuchibhotla et al. 2008). En se basant sur les couplages de récepteurs décrit précédemment et sur la démonstration que le CD36 et le GHS-R1a convergent vers la régulation de la voie Src-MAPK, on peut formuler l'hypothèse qu'il pourrait y avoir formation d'hétérodimères CD36-GHS-R1a. Lors d'expériences préliminaires, nous avons été incapables de détecter une coimmunoprécipitation entre les récepteurs CD36 et GHS-R1a. Nous avons opté pour une approche traditionnelle de coimmunoprécipitation suivie d'immunoblot. Cependant certaines alternatives auraient pu être envisagées, comme l'étude de transfert d'énergie par bioluminescence ou fluorescence (BRET/FRET) qui pourraient permettre de détecter l'évolution des différents mécanismes de recrutement sur une population spécifique de cellules. Cette approche aurait aussi pu être favorisée lors des études d'interaction entre GHS-R1a et Fyn, puisque suivre en temps réel et dans des

cellules vivantes le phénomène offre l'opportunité d'une compréhension plus fine des mécanismes d'interaction entre les différents effecteurs.

L'activation parallèle des récepteurs CD36 et GHS-R1a peut être perçue comme un inconvénient causé par un manque de spécificité, mais elle pourrait agir comme avantage en induisant une réponse cellulaire distincte dépendante de l'expression des deux récepteurs. (Triantafilou et al. 2007)

8.2 Mécanismes d'interaction des cofacteurs de PPAR γ suite à l'activation du CD36 et du GHS-R1a

Les travaux de cette thèse montrent que PPAR γ joue un rôle central dans la régulation du métabolisme lipidique du macrophage par l'activation des récepteurs CD36 et GHS-R1a. Bien que plusieurs observations suggèrent l'implication d'un recrutement différentiel de cofacteurs dans la réponse de PPAR γ , d'autres études sont requises pour confirmer cette affirmation. Il serait d'abord intéressant de vérifier par coimmunoprécipitation si les cofacteurs CBP/p300, SRC-3, SRC-1 et PGC-1 sont impliqués dans la régulation de l'activité de PPAR γ dans les macrophages THP-1. Par la suite, l'influence du site S84 pourrait être étudiée en surexprimant la construction mutante PPAR γ S84A par adénovirus dans les THP-1. Ceci nous permettrait d'ailleurs de discriminer les effets de la ghéline qui proviennent de l'activation de la voie G α q/PI3-K/Akt de ceux résultant de Fyn/Dok-1/ERK1/2. De plus, des études subséquentes pourraient être effectuées afin de déterminer le recrutement de PPAR γ sur les PPRE des gènes cibles (CD36, LXR α , MCP-1) par essai de

coimmunoprécipitation de la chromatine. Il serait pertinent de déterminer si le recrutement de PPAR γ au PPRE pourrait être corrélé avec celui de la machinerie transcriptionnelle (par exemple la polymérase II) afin de s'assurer que la présence de PPAR γ au PPRE résulte en une activation de la transcription.

8.3 Profil d'expression des médiateurs inflammatoires

De nombreux travaux indiquent que l'activation de PPAR γ , ainsi que le traitement par la ghréline, influencent tous les deux la production de cytokines inflammatoires et le recrutement des cellules au site de l'athérome (Bulgarelli et al. 2009; Qiao et al. 2008; Szanto and Nagy 2008). Il serait ainsi intéressant de documenter les profils sélectifs d'expression des cytokines en réponse à l'activation du CD36 ou du GHS-R1a et des 2 récepteurs simultanément. Pour ce, il serait pertinent de doser la présence de cytokines dans le surnageant des THP-1 ou des macrophages péritonéaux en culture (CCL-3, TNF- α , MCP-1, Il-8, Il-6 Il-1 β).

9 Conclusions générales

Malgré les progrès réalisés dans la compréhension du développement de l'athérosclérose au cours des deux dernières décennies, la thérapie de l'athérosclérose reste un sujet non résolu. Les macrophages semblent la cible thérapeutique par excellence dans la réduction de la formation des plaques athérosclérotiques. Puisque la régulation transcriptionnelle de PPAR γ au niveau du macrophage constitue une étape clé dans le métabolisme lipidique de ces

cellules, les voies de signalisation impliquées dans l'activation et la régulation transcriptionnelle de PPAR γ suite à l'activation des récepteurs membranaires CD36 et GHS-R1a au niveau des macrophages représentent des cibles thérapeutiques de choix dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques potentielles pour le traitement de l'athérosclérose.

Bibliographie

- Abizaid A, Horvath TL (2008) Brain circuits regulating energy homeostasis. *Regul Pept* 149:3-10
- Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA (1993) Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* 268:17665-17668
- Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G (2007) Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8:639-646
- Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M (1994) Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J. Biol. Chem.* 269:21003-21009
- Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK (1997) Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor γ is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J. Biol. Chem.* 272:5128
- Adorni MP, Zimetti F, Billheimer JT, Wang N, Rader DJ, Phillips MC, Rothblat GH (2007) The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J. Lipid Res.* 48:2453-2462
- Allen T, Zhang F, Moodie SA, Clemens LE, Smith A, Gregoire F, Bell A, Muscat GEO, Gustafson TA (2006) Halofenate Is a Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Modulator With Antidiabetic Activity. *Diabetes* 55:2523-2533
- Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M (2000) The common PPAR γ Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 26:76-80
- Andersen M, Lenhard B, Whatling, Eriksson P, Odeberg J (2006) Alternative promoter usage of the membrane glycoprotein CD36. *BMC Mol Biol Mer* 3:8
- Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D, Small CJ (2004) AMP-activated Protein Kinase Plays a Role in the Control of Food Intake. *J Biol Chem* 279:12005-12008
- Andreis PG, Malendowicz LK, Trejter M, Neri G, Spinazzi R, Rossi GP, Nussdorfer GG (2003) Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor are expressed in the rat adrenal cortex: evidence that ghrelin stimulates the growth, but not the secretory activity of adrenal cells. *FEBS Lett* 536:173-179
- Andrews ZB, Liu Z-W, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschop MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao X-B, Horvath TL, Diano S (2008) UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454:846-851

- Aneskievich BJ (2001) Deletion of RAR Carboxyl Terminus Reveals Promoter- and Receptor-Specific AF-1 Effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289:950-956
- Argmann CA, Van Den Diepstraten CH, Sawyez CG, Edwards JY, Hegele RA, Wolfe BM, Huff MW (2001) Transforming Growth Factor- β 1 Inhibits Macrophage Cholesteryl Ester Accumulation Induced by Native and Oxidized VLDL Remnants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:2011-2018
- Armesilla AL, Vega MA (1994) Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 269:18985-18991
- Arnaldi G, Mancini T, Kola B, Appolloni G, Freddi S, Concettoni C, Bearzi I, Masini A, Boscaro M, Mantero F (2003) Cyclical Cushing's Syndrome in a Patient with a Bronchial Neuroendocrine Tumor (Typical Carcinoid) Expressing Ghrelin and Growth Hormone Secretagogue Receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5834-5840
- Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva 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. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1169-1174
- Asakawa A, Inui A, Kaga T, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, Kasuga M (2003) Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 52:947-952
- Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Fujimiya M, Katsuura G, Makino S, Fujino MA, Kasuga M (2001) A Role of Ghrelin in Neuroendocrine and Behavioral Responses to Stress in Mice. *Neuroendocrinology* 74:143-7
- Asch A, Liu I, Briccetti F, Barnwell J, Kwakye-Berko F, Dokun A, Goldberger J, Pernambuco M (1993) Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. *Science* 262:1436-1440
- Astesano A, Regnaud K, Ferrand N, Gingras D, Bendayan M, Rosselin G, Emami S (1999) Cellular and Subcellular Expression of Golf/Gs and Gq/G11 α -Subunits in Rat Pancreatic Endocrine Cells. *J. Histochem. Cytochem.* 47:289-302
- Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou J, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H (1997) Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 46:1319-1327
- Auwerx J (1999) PPARgamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 42:1033-1049
- Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, Vinson JA (2003) Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat Res* 523-524:87-97
- Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, Malan D, Baj G, Granata R, Broglio F, Papotti M, Surico N, Bussolino F, Isgaard J, Deghenghi R, Sinigaglia F, Prat M, Muccioli G, Ghigo E, Graziani aA (2002) Ghrelin and des-

- acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 159:1029-1037
- Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, Husemann J, Landreth GE (2003) A Cell Surface Receptor Complex for Fibrillar beta -Amyloid Mediates Microglial Activation. *J. Neurosci.* 23:2665-2674
- Bannister AJ, Kouzarides T (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384:641-643
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P (1999) PPAR γ is recruited for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell.* 4:585
- Barazzoni R, Bosutti A, Stebel M, Cattin MR, Roder E, Visintin L, Cattin L, Biolo G, Zanetti M, Guarnieri G (2005) Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E228-235
- Barreiro ML, Gaytan F, Castellano JM, Suominen JS, Roa J, Gaytan M, Aguilar E, Dieguez C, Toppari J, Tena-Sempere M (2004) Ghrelin Inhibits the Proliferative Activity of Immature Leydig Cells in Vivo and Regulates Stem Cell Factor Messenger Ribonucleic Acid Expression in Rat Testis. *Endocrinology* 145:4825-4834
- Barroso I, Gurnell M, Crowley VEF, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TDM, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VKK, O'Rahilly S (1999) Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402:880-883
- Barzon L, Pacenti M, Masi G, Stefani A, Fincati K, Palù G (2005) Loss of growth hormone secretagogue receptor 1a and overexpression of type 1b receptor transcripts in human adrenocortical tumors. *Oncology* 68:414-21
- Bastie CC, Zong H, Xu J, Busa B, Judex S, Kurland IJ, Pessin JE (2007) Integrative Metabolic Regulation of Peripheral Tissue Fatty Acid Oxidation by the Src Kinase Family Member Fyn. *Cell Metab* 5:371-381
- Beck B, Richy S, Stricker-Krongrad A (2004) Feeding response to ghrelin agonist and antagonist in lean and obese Zucker rats. *Life Sci* 76:473-478
- Belvisi MG, Hele DJ, Birrell MA (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists as therapy for chronic airway inflammation. *Eur J Pharmacol* 533:101-109
- Bente H, Kari O, Tuva BD, Mona S, Lars G, Erik O, Pal A (2008) Atherosclerotic Plaque Stability: What Determines the Fate of a Plaque? *Prog Cardiovasc Dis* 51:183-194
- Berger J, Moller DE (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev of Med* 53:409-435
- Berger JP, Petro AE, Macnaul KL, Kelly LJ, Zhang BB, Richards K, Elbrecht A, Johnson BA, Zhou G, Doebber TW, Biswas C, Parikh M, Sharma N, Tanen MR, Thompson GM, Ventre J, Adams AD, Mosley R, Surwit RS, Moller DE (2003) Distinct Properties and Advantages of a Novel Peroxisome Proliferator-Activated Protein γ Selective Modulator. *Mol Endocrinol* 17:662-676
- Bianchi ME, Manfredi AA (2007) High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 220:35-46

- Blake AD, Smith RG (1991) Desensitization studies using perfused rat pituitary cells show that growth hormone-releasing hormone and His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ stimulate growth hormone release through distinct receptor sites. *J Endocrinol* 129:11-19
- Bodart V, Febbraio M, Demers A, McNicoll N, Pohankova P, Perreault A, Sejlitz T, Escher E, Silverstein RL, Lamontagne D, Ong H (2002) CD36 Mediates the Cardiovascular Action of Growth Hormone-Releasing Peptides in the Heart. *Circ Res* 90:844-849
- Bodles AM, Varma V, Yao-Borengasser A, Phanavanh B, Peterson CA, McGehee RE, Jr., Rasouli N, Wabitsch M, Kern PA (2006) Pioglitazone induces apoptosis of macrophages in human adipose tissue. *J. Lipid Res.* 47:2080-2088
- Bogacka I, Xie H, Bray GA, Smith SR (2004) The effect of pioglitazone on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes related to lipid storage in vivo. *Diabetes Care* 27:1660-1667
- Bonen A, Parolin ML, Steinberg GR, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JFC, Luiken JJFP, Heigenhauser GJF, Dyck DJ (2004) Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *FASEB J*:03-1065fje
- Boullier A, Bird DA, Chang MIK, Dennis EA, Friedman P, Gillotte-Taylor K, Wulf SHR, Quehenberger PO, Shaw P, Steinberg D, Terpstra V, Witztum JL (2001) Scavenger Receptors, Oxidized LDL, and Atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 947:214-223
- Boullier A, Li Y, Quehenberger O, Palinski W, Tabas I, Witztum JL, Miller YI (2006) Minimally Oxidized LDL Offsets the Apoptotic Effects of Extensively Oxidized LDL and Free Cholesterol in Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1169-1176
- Bour G, Gaillard E, Bruck N, Lalevée S, Plassat J-L, Busso D, Samama J-P, Rochette-Egly C (2005) Cyclin H binding to the RAR α activation function (AF)-2 domain directs phosphorylation of the AF-1 domain by cyclin-dependent kinase 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16608-16613
- Bowers CY (1993) GH-releasing peptides: structure and kinetics. *J Pediatr Endocrinol* 6:21-31
- Bowers CY, Chang J, Momany F, Folkers K (1977) Effects of enkephalins and enkephalins analogs on release of pituitary hormones in vitro. In: MacIntyre I, Szelke H, eds. *Molecular endocrinology*. Amsterdam: Elsevier:287-92
- Bowers CY, Momany F, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Chang K (1980) Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology* 106:663-7
- Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA, 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
- Bowers CY, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Chang K, Y MF (1981) A study on the regulation of growth hormone release from the pituitaries of rats in vitro. *Endocrinology* 108:1071-80

- Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W (1996) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology* 137:354-366
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179:77-9
- Brendel C, Gelman L, Auwerx J (2002) Multiprotein Bridging Factor-1 (MBF-1) Is a Cofactor for Nuclear Receptors that Regulate Lipid Metabolism. *Mol Endocrinol* 16:1367-1377
- Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, Lely AJvd, Deghenghi R, Ghigo E (2001) Ghrelin, a Natural GH Secretagogue Produced by the Stomach, Induces Hyperglycemia and Reduces Insulin Secretion in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5083-6
- Broglio F, Benso A, Castiglioni C, Gottero C, Prodam F, Destefanis S, Gauna C, van der Lely AJ, Deghenghi R, Bo M, Arvat E, Ghigo E (2003) The Endocrine Response to Ghrelin as a Function of Gender in Humans in Young and Elderly Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1537-1542
- Broglio F, Prodam F, Riganti F, Gottero C, Destefanis S, Granata R, Muccioli G, Aribat T, Lely AJvd, Ghigo E (2008) The continuous infusion of acylated ghrelin enhances growth hormone secretion and worsens glucose metabolism in humans. *J Endocrinol Invest* 31:788-794
- Brunetti L, Recinella L, Orlando G, Michelotto B, Di Nisio C, Vacca M (2002) Effects of ghrelin and amylin on dopamine, norepinephrine and serotonin release in the hypothalamus. *Eur J Pharmacol* 454:189-192
- Bruni F, Pasqui AL, Pastorelli M, Bova G, Cercignani M, Palazzuoli A, Sawamura T, Auteri A, Puccetti L (2005) Different Effect of Statins on Platelet Oxidized-LDL Receptor (CD36 and LOX-1) Expression in Hypercholesterolemic Subjects. *Clin Appl Thromb Hemost* 11:417-428
- Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Kwiecien S, Drozdowicz D, Bielanski W, Pajdo R, Ptak A, Nikiforuk A, Pawlik WW, Hahn EG (2004) Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress-induced gastric damage. *Regul Pept* 120:39-51
- Brzozowski T, Konturek PC, Sliwowski Z, Pajdo R, Drozdowicz D, Kwiecien S, Burnat G, Konturek SJ, Pawlik WW (2006) Prostaglandin/Cyclooxygenase Pathway in Ghrelin-Induced Gastroprotection against Ischemia-Reperfusion Injury. *J Pharmacol Exp Ther* 319:477-487
- Bugge A, Grontved L, Aagaard MM, Borup R, Mandrup S (2009) The PPAR γ 2 A/B-domain plays a gene specific role in transactivation and co-factor recruitment. *Mol Endocrinol* 23:794-808
- Bugge TH, Pohl J, Lonnoy O, Stunnenberg HG (1992) RXR α , a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Embo Journal* 11:1409-1418
- Bulgarelli I, Tamiazzo L, Bresciani E, Rapetti D, Caporali S, Lattuada D, Locatelli V, Torsello A (2009) Desacyl-ghrelin and synthetic GH-secretagogues modulate the

- production of inflammatory cytokines in mouse microglia cells stimulated by beta-amyloid fibrils. *J Neurosci Res* 87:2718-2727
- Burgermeister E, Schnoebelen A, Flament A, Benz J, Stihle M, Gsell B, Rufer A, Ruf A, Kuhn B, Marki HP, Mizrahi J, Sebokova E, Niesor E, Meyer M (2006) A Novel Partial Agonist of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPAR γ) Recruits PPAR γ -Coactivator-1 α , Prevents Triglyceride Accumulation, and Potentiates Insulin Signaling in Vitro. *Mol Endocrinol* 20:809-830
- Burkart EM, Sambandam N, Han X, Gross RW, Courtois M, Gierasch CM, Shoghi K, Welch MJ, Kelly DP (2007) Nuclear receptors PPAR β/δ and PPAR α direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *J Clin Invest* 117:3930-3939
- Camina JP, Carreira MC, El Messari S, Llorens-Cortes C, Smith RG, Casanueva FF (2004) Desensitization and Endocytosis Mechanisms of Ghrelin-Activated Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a. *Endocrinology* 145:930-940
- Camina JP, Lodeiro M, Ischenko O, Martini AC, Casanueva FF (2007) Stimulation by ghrelin of p42/p44 mitogen-activated protein kinase through the GHS-R1a receptor: Role of G-proteins and beta-arrestins. *J Cell Physiol* 213:187-200
- Caminos JE, Gualillo O, Lago F, Otero M, Blanco M, Gallego R, Garcia-Caballero T, Goldring MB, Casanueva FF, Gomez-Reino JJ, Dieguez C (2005) The Endogenous Growth Hormone Secretagogue (Ghrelin) Is Synthesized and Secreted by Chondrocytes. *Endocrinology* 146:1285-1292
- Camp HS, Tafuri SR (1997) Regulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma Activity by Mitogen-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 272:10811-10816
- Camp HS, Tafuri SR, Leff T (1999) c-Jun N-Terminal Kinase Phosphorylates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ 1 and Negatively Regulates Its Transcriptional Activity. *Endocrinology* 140:392-397
- Cao J-M, Ong H, Chen C (2006) Effects of ghrelin and synthetic GH secretagogues on the cardiovascular system. *Trends Endocrinol Metab* 17:13-18
- Cassoni P, Ghe C, Marrocco T, Tarabra E, Allia E, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Papotti M, Muccioli G (2004) Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *Eur J Endocrinol* 150:173-184
- Cassoni P, Papotti M, Ghe C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, Deghenghi R, Reissmann T, Ghigo E, Muccioli G (2001) Identification, Characterization, and Biological Activity of Specific Receptors for Natural (Ghrelin) and Synthetic Growth Hormone Secretagogues and Analogs in Human Breast Carcinomas and Cell Lines. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1738-1745
- Cha BS, Carter L, Nikoulina S, Mohideen P, Mudaliar S, Mukherjee R, Peterniti J, Ciaraldi TP (1999) Synergistic effects of PPAR gamma and RXR agonists on glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle cells. *Diabetes* 48:0795
- Chang AJ, Song DH, Wolfe MM (2006) Attenuation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Mediates Gastrin-stimulated Colorectal Cancer Cell Proliferation. *J. Biol. Chem.* 281:14700-14710

- Chang L, Ren Y, Liu X, Li WG, Yang J, Geng B, Weintraub NL, ang C (2004) Protective Effects of Ghrelin on Ischemia/Reperfusion Injury in the Isolated Rat Heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 43:165-170
- Chawla A, Boisvert WA, Lee C-H, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P (2001) A PPAR γ -LXR-ABCA1 Pathway in Macrophages Is Involved in Cholesterol Efflux and Atherogenesis. *Molecular Cell* 7:161-171
- Chen C, Wu D, Clarke IJ (1996) Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs. *J Endocrinol* 148:381-386
- Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM (1997) Nuclear Receptor Coactivator ACTR Is a Novel Histone Acetyltransferase and Forms a Multimeric Activation Complex with P/CAF and CBP/p300. *90:569-580*
- Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarh DT, Adams JR, Frazier EG, Shen Z, Marsh DJ, Feighner SD, Guan XM, Ye Z, Nargund RP, Smith RG, Van der Ploeg LHT, Howard AD, MacNeil DJ, Qian S (2004) Orexigenic Action of Peripheral Ghrelin Is Mediated by Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein. *Endocrinology* 145:2607-2612
- Chen J, Liu X, Shu Q, Li S, Luo F (2008) Ghrelin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through NO pathway. *Med Sci Monit* 14:BR141-146
- Chen JD, Evans RM (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377:454-457
- Chen M, Yang Y, Braunstein E, Georgeson KE, Harmon CM (2001) Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E916-923
- Chen M, Yang Y-K, Loux TJ, Georgeson KE, Harmon CM (2006) The role of hyperglycemia in FAT/CD36 expression and function. *Pediatr Surg Int* 22:647-654
- Cheng K, Chan WW, Barreto AJ, M CE, G SR (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
- Cheng K, Chan WW, Butler B, Barreto AJ, Smith RG (1991) Evidence for a role of protein kinase-C in His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂-induced growth hormone release from rat primary pituitary cells. *Endocrinology* 129:3337-42
- Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart J-C, Chapman J, Najib J, Staels B (1998) Activation of Proliferator-activated Receptors α and γ Induces Apoptosis of Human Monocyte-derived Macrophages. *J. Biol. Chem.* 273:25573-25580
- Choi K, Roh S-G, Hong Y-H, Shrestha YB, Hishikawa D, Chen C, Kojima M, Kangawa K, Sasaki S-I (2003) The Role of Ghrelin and Growth Hormone Secretagogues Receptor on Rat Adipogenesis. *Endocrinology* 144:754-759

- Choi KM, Lee J, Lee KW, Seo JA, Oh JH, Kim SG, Kim NH, Choi DS, Baik SH (2004) The associations between plasma adiponectin, ghrelin levels and cardiovascular risk factors. *Eur J Endocrinol* 150:715-718
- Chorny A, Anderson P, Gonzalez-Rey E, Delgado M (2008) Ghrelin Protects against Experimental Sepsis by Inhibiting High-Mobility Group Box 1 Release and by Killing Bacteria. *J Immunol* 180:8369-8377
- Chow KBS, Leung P-K, Cheng CHK, Cheung W-T, Wise H (2008) The constitutive activity of ghrelin receptors is decreased by co-expression with vasoactive prostanoid receptors when over-expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Int J Biochem Cell Biol* 40:2627-2637
- Chu K-M, Chow KBS, Leung P-K, Lau P-N, Chan C-B, Cheng CHK, Wise H (2007) Over-expression of the truncated ghrelin receptor polypeptide attenuates the constitutive activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C by ghrelin receptors but has no effect on ghrelin-stimulated extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity. *Int J Biochem Cell Biol* 39:752-764
- Chung H, Seo S, Moon M, Park S (2008) Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 β and ERK1/2 pathways mediate protective effects of acylated and unacylated ghrelin against oxygen-glucose deprivation-induced apoptosis in primary rat cortical neuronal cells. *J Endocrinol* 198:511-521
- Chung SW, Kang BY, Kim SH, Pak YK, Cho D, Trinchieri G, Kim TS (2000) Oxidized Low Density Lipoprotein Inhibits Interleukin-12 Production in Lipopolysaccharide-activated Mouse Macrophages via Direct Interactions between Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ and Nuclear Factor- κ B. *J. Biol. Chem.* 275:32681-32687
- Cimini A, Bernardo A, Cifone G, Muzio LD, Loreto SD (2003) TNF α downregulates PPAR δ expression in oligodendrocyte progenitor cells: Implications for demyelinating diseases. *Glia* 41:3-14
- Clezardin P, Frappart L, Clerget M, Pechoux C, Delmas PD (1993) Expression of Thrombospondin (TSP1) and Its Receptors (CD36 and CD51) in Normal, Hyperplastic, and Neoplastic Human Breast. *Cancer Res* 53:1421-1430
- Coiro V, Saccani-Jotti G, Minelli R, Melani A, Milli B, Manfredi G, Volpi R, Chiodera P (2005) Adrenocorticotropin/Cortisol and Arginine-Vasopressin Secretory Patterns in Response to Ghrelin in Normal Men. *Neuroendocrinology* 81:103-106
- Compe E, Drane P, Laurent C, Diderich K, Braun C, Hoeijmakers JHJ, Egly J-M (2005) Dysregulation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Target Genes by XPD Mutations. *Mol. Cell. Biol.* 25:6065-6076
- Conconi MT, Nico B, Guidolin D, Baiguera S, Spinazzi R, Rebuffat P, Malendowicz LK, Vacca A, Carraro G, Parnigotto PP, Nussdorfer GG, Ribatti D (2004) Ghrelin inhibits FGF-2-mediated angiogenesis in vitro and in vivo. *Peptides* 25:2179-2185
- Coort SLM, Hasselbaink DM, Koonen DPY, Willems J, Coumans WA, Chabowski A, van der Vusse GJ, Bonen A, Glatz JFC, Luiken JJFP (2004) Enhanced Sarcolemmal FAT/CD36 Content and Triacylglycerol Storage in Cardiac Myocytes From Obese Zucker Rats. *Diabetes* 53:1655-1663

- Corpeleijn E, van der Kallen CJH, Kruijshoop M, Magagnin MGP, de Bruin TWA, Feskens EJM, Saris WHM, Blaak EE (2006) Direct association of a promoter polymorphism in the CD36/FAT fatty acid transporter gene with Type 2 diabetes mellitus and insulin resistance. *Diabetic Medicine* 23:907-911
- Costa T, Cotecchia S (2005) Historical review: Negative efficacy and the constitutive activity of G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 26:618-624
- Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR (2000) Sterol-dependent Transactivation of the ABC1 Promoter by the Liver X Receptor/Retinoid X Receptor. *J. Biol. Chem.* 275:28240-28245
- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL (2003) The Distribution and Mechanism of Action of Ghrelin in the CNS Demonstrates a Novel Hypothalamic Circuit Regulating Energy Homeostasis. *Neuron* 37:649-661
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS (2001) A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans. *Diabetes* 50:1714-1719
- Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Maffia P, Patel NSA, Di Paola R, Ialenti A, Genovese T, Chatterjee PK, Di Rosa M, Caputi AP, Thiemermann C (2004) Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ , reduces acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 483:79-93
- Dalen KT, Schoonjans K, Ulven SM (2004) Adipose tissue expression of the lipid droplet-associated proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* 53:1243-1252
- Dass NB, Munonyara M, Bassil AK, Hervieu GJ, Osbourne S, Corcoran S, Morgan M, Sanger GJ (2003) Growth hormone secretagogue receptors in rat and human gastrointestinal tract and the effects of ghrelin. *Neuroscience* 120:443-453
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, 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
- Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S (2002) Ghrelin Is Present in Pancreatic α -Cells of Humans and Rats and Stimulates Insulin Secretion. *Diabetes* 51:124-129
- Daugherty A, Roselaar SE (1995) Lipoprotein oxidation as a mediator of atherogenesis: insights from pharmacological studies. *Cardiovasc Res* 29:297-311
- de Oliveira Silva C, Delbosc S, Araújo C, Monnier L, Cristol J-P, Pares-Herbute N (2008) Modulation of CD36 protein expression by AGEs and insulin in aortic VSMCs from diabetic and non-diabetic rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18:23-30

- De Vriese C, Gregoire F, De Neef P, Robberecht P, Delporte C (2005) Ghrelin Is Produced by the Human Erythroleukemic HEL Cell Line and Involved in an Autocrine Pathway Leading to Cell Proliferation. *Endocrinology* 146:1514-1522
- Debril M-B, Gelman L, Fayard E, Annicotte J-S, Rocchi S, Auwerx J (2004) Transcription Factors and Nuclear Receptors Interact with the SWI/SNF Complex through the BAF60c Subunit. *J Biol Chem* 279:16677-16686
- Deeb SS, Fajas L, Nemoto M (1998) A Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 20:284-287
- Deghenghi R (1997) The development of 'impervious peptides' as growth hormone secretagogues. *Acta Paediatr Suppl* 423:85-87
- Delhanty PJD, van der Eerden BCJ, van der Velde M, Gauna C, Pols HAP, Jahr H, Chiba H, van der Lely AJ, van Leeuwen JPTM (2006) Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways in the absence of GHS-R1a. *J Endocrinol* 188:37-47
- Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Tomaszewska R, Stachura J, Konturek S, Konturek P (2003) Ghrelin attenuates the development of acute pancreatitis in rat. *J Physiol Pharmacol.* 54:561-73
- Demers A, McNicoll N, Febbraio M, Servant M, Marleau S, Silverstein R, Ong H (2004) Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem J* 382:417-424
- Dennis AP, O'Malley BW (2005) Rush hour at the promoter: How the ubiquitin-proteasome pathway polices the traffic flow of nuclear receptor-dependent transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93:139-151
- Dezaki K, Kakei M, Yada T (2007) Ghrelin Uses G α _{i2} and Activates Voltage-Dependent K⁺ Channels to Attenuate Glucose-Induced Ca²⁺ Signaling and Insulin Release in Islet β -Cells: Novel Signal Transduction of Ghrelin. *Diabetes* 56:2319-2327
- Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Nakata M, Kakei M, Nagai H, Hosoda H, Kangawa K, Yada T (2006) Blockade of Pancreatic Islet-Derived Ghrelin Enhances Insulin Secretion to Prevent High-Fat Diet-Induced Glucose Intolerance. *Diabetes* 55:3486-3493
- Diano S, Farr S, Benoit S, McNay E, da Silva I, Horvath B, Gaskin F, Nonaka N, Jaeger L, Banks W, Morley J, Pinto S, Sherwin R, Xu L, Yamada K, Sleeman M, Tschöp M, Horvath T (2006) Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat Neurosci* 9:381-388
- Dixit V, Schaffer E, Pyle R, Collins G, Sakthive IS, Palaniappan R, Lillard JJ, Taub D (2004) Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest* 114:10
- Dixit VD, Taub DD (2005) Ghrelin and immunity: A young player in an old field. *Exp Gerontol* 40:900-910

- Doi T, Higashino K, Kurihara Y, Wada Y, Miyazaki T, Nakamura H, Uesugi S, Imanishi T, Kawabe Y, Itakura H (1993) Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem* 268:2126-2133
- Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ (2005) Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet* 366:1279-1289
- Dubuquoy L, Rousseaux C, Thuru X, Peyrin-Biroulet L, Romano O, Chavatte P, Chamailard M, Desreumaux P (2006) PPAR γ as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut* 55:1341-1349
- Duxbury MS, Waseem T, Ito H, Robinson MK, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE (2003) Ghrelin promotes pancreatic adenocarcinoma cellular proliferation and invasiveness. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309:464-468
- Elahi MM, Naseem KM, Matata BM (2007) Nitric oxide in blood. *FEBS J* 274:906-923
- Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA (1993) CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 268:11811-11816
- Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B (2001) Rat PPARs: Quantitative Analysis in Adult Rat Tissues and Regulation in Fasting and Refeeding. *Endocrinology* 142:4195-4202
- Eto M, Yoshikawa H, Fujimura H, Naba I, Sumi-Akamaru H, Takayasu S, Itabe H, Sakoda S (2003) The role of CD36 in peripheral nerve remyelination after crush injury. *Eur J Neurosci* 17:2659-2666
- Fajas L, Egler V, Reiter R, Hansen J, Kristiansen K, Debril M-B, Miard S, Auwerx J (2002) The Retinoblastoma-Histone Deacetylase 3 Complex Inhibits PPAR γ and Adipocyte Differentiation. *Dev Cell* 3:903-910
- Fajas L, Fruchart J-C, Auwerx J (1998) PPAR γ 3 mRNA: a distinct PPAR γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* 438:55-60
- Fan J, Watanabe T (2003) Inflammatory Reactions in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 10:63-71
- Fan Y, Wang Y, Tang Z, Zhang H, Qin X, Zhu Y, Guan Y, Wang X, Staels B, Chien S, Wang N (2008) Suppression of Pro-inflammatory Adhesion Molecules by PPAR δ in Human Vascular Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:315-321
- Faus H, Haendler B (2006) Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother* 60:520-528
- Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SFA, Silverstein RL (1999) A Null Mutation in Murine CD36 Reveals an Important Role in Fatty Acid and Lipoprotein Metabolism. *J Biol Chem* 274:19055-19062
- Febbraio M, Podrez E, Smith J, David P, Hajjar SLH, Henry F, Hoff, Kavita Sharma, and Roy L. Silverstein (2000) Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 105:1049-1056

- Feige JN, Gelman L, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B (2005) Fluorescence Imaging Reveals the Nuclear Behavior of Peroxisome Proliferator-activated Receptor/Retinoid X Receptor Heterodimers in the Absence and Presence of Ligand. *J Biol Chem* 280:17880-17890
- Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Palyha OC, Hreniuk DL, Pong S-S, Austin CP, Figueroa D, MacNeil D, Cascieri MA, Nargund R, Bakshi R, Abramovitz M, Stocco R, Kargman S, O'Neill G, Van Der Ploeg LH, nbsp, T, Evans J, Patchett AA, Smith RG, Howard AD (1999) Receptor for Motilin Identified in the Human Gastrointestinal System. *Science* 284:2184-2188
- Feng J, Han J, Pearce SFA, Silverstein RL, Gotto AM, Jr., Hajjar DP, Nicholson AC (2000) Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR- γ . *J. Lipid Res.* 41:688-696
- Fernandez-Ruiz E, Armesilla AL, Sanchez-Madrid F, Vega MA (1993) Gene Encoding the Collagen Type I and Thrombospondin Receptor CD36 Is Located on Chromosome 7q11.2. *Genomics* 17:759-761
- Ferre P (2004) The Biology of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Relationship With Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity. *Diabetes* 53:S43-50
- Festuccia WT, Blanchard P-G, Turcotte V, Laplante M, Sariahmetoglu M, Brindley DN, Richard D, Deshaies Y (2009) The PPAR γ agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*:91012.2008
- Floyd ZE, Stephens JM (2002) Interferon- γ -mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPAR γ in adipocytes. *J Biol Chem* 277:4062-4068
- Floyd ZE, Stephens JM (2004) Control of peroxisome proliferator-activated receptor γ stability and activity by SUMOylation. *Obes Res* 12:921-928
- Forman BM, Chen J, Evans RM (1997) Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4312-4317
- Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans RM, Weinberger C (1995a) Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* 81:687-693
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM (1995b) 15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 83:803-812
- Frascarelli S, Ghelardoni S, Ronca-Testoni S, Zucchi R (2003) Effect of ghrelin and synthetic growth hormone secretagogues in normal and ischemic rat heart. *Basic Res Cardiol* 98:401-405
- Freedman LP (1999) Increasing the Complexity of Coactivation in Nuclear Receptor Signaling. *Cell* 97:5-8
- Fuhrman B, Judith O, Keidar S, Ben-Yaish L, Kaplan M, Aviram M (1997) Increased Uptake of LDL by Oxidized Macrophages is the Result of an Initial Enhanced LDL Receptor Activity and of a Further Progressive Oxidation of LDL. *Free Radic Biol Med* 23:34-46

- Fuhrman B, Partoush A, Volkova N, Aviram M (2008) Ox-LDL induces monocyte-to-macrophage differentiation in vivo: Possible role for the macrophage colony stimulating factor receptor (M-CSF-R). *Atherosclerosis* 196:598-607
- Fukuchi K, Nozaki S, Yoshizumi T, Hasegawa S, Uehara T, Nakagawa T, Kobayashi T, Tomiyama Y, Yamashita S, Matsuzawa Y, Nishimura T (1999) Enhanced Myocardial Glucose Use in Patients with a Deficiency in Long-Chain Fatty Acid Transport (CD36 Deficiency). *J Nucl Med* 40:239-243
- Fukui Y, Masui S, Osada S, Umesono K, Motojima K (2000) A new thiazolidinedione, NC-2100, which is a weak PPAR-gamma activator, exhibits potent antidiabetic effects and induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of KKAY obese mice. *Diabetes* 49:759
- Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H, Takeda S, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kangawa K, Nagata K, Kojima M (2005) Ghrelin Directly Regulates Bone Formation. *J Bone Miner Res* 20:790-798
- Gao X-Y, Kuang H-Y, Liu X-M, Duan P, Yang Y, Ma Z-B (2009) Circulating ghrelin/obestatin ratio in subjects with Helicobacter pylori infection. *Nutrition* 25:506-511
- Gauna C, Delhanty PJD, Hofland LJ, Janssen JAMJL, Broglio F, Ross RJM, Ghigo E, van der Lely AJ (2005) Ghrelin Stimulates, Whereas Des-Octanoyl Ghrelin Inhibits, Glucose Output by Primary Hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1055-1060
- Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M (2003) Immunolocalization of Ghrelin and Its Functional Receptor, the Type 1a Growth Hormone Secretagogue Receptor, in the Cyclic Human Ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 88:879-887
- Gearing KL, Göttlicher M, Teboul M, Widmark E, Gustafsson JA (1993) Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1440-1444
- Gelman L, Zhou G, Fajas L, Raspe E, Fruchart J-C, Auwerx J (1999) p300 Interacts with the N- and C-terminal Part of PPARgamma 2 in a Ligand-independent and -dependent Manner, Respectively. *J. Biol. Chem.* 274:7681-7688
- Genini D, Catapano CV (2006) Control of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Fate by the Ubiquitin-Proteasome System. *J Recept Signal Transduct Res* 26:679 - 692
- Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Marrocco T, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M (2002) The Antiproliferative Effect of Synthetic Peptidyl GH Secretagogues in Human CALU-1 Lung Carcinoma Cells. *Endocrinology* 143:484-491
- Ghigo E, Arvat E, Giordano R, Broglio F, Gianotti L, Maccario M, Bisi G, Graziani A, Papotti M, Muccioli G, Deghenghi R, Camanni F (2001) Biologic activities of growth hormone secretagogues in humans. *Endocrine* 14:87-93
- Ghosh S, Hayden MS (2008) New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8:837-848
- Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M (2002) The Tissue Distribution of the

- mRNA of Ghrelin and Subtypes of Its Receptor, GHS-R, in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2988-
- Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M (2006) Therapeutic Action of Ghrelin in a Mouse Model of Colitis. *Gastroenterology* 130:1707-1720
- Good D, Polverini P, Rastinejad F, Le Beau M, Lemons R, Frazier W, Bouck N (1990) A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6624-6628
- Grainger DJ (2007) TGF- β and atherosclerosis in man. *Cardiovasc Res* 74:213-222
- Granado M, Martin AI, Lopez-Menduina M, Lopez-Calderon A, Villanua MA (2008) GH-releasing peptide-2 administration prevents liver inflammatory response in endotoxemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E131-141
- Granado M, Priego T, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A (2005) Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E486-492
- Granata R, Settanni F, Biancone L, Trovato L, Nano R, Bertuzzi F, Destefanis S, Annunziata M, Martinetti M, Catapano F, Ghe C, Isgaard J, Papotti M, Ghigo E, Muccioli G (2007) Acylated and Unacylated Ghrelin Promote Proliferation and Inhibit Apoptosis of Pancreatic β -Cells and Human Islets: Involvement of 3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate/Protein Kinase A, Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2, and Phosphatidyl Inositol 3-Kinase/Akt Signaling. *Endocrinology* 148:512-529
- Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Moos MC, Jr., Londos C, Kimmel AR (1993) Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:12035-12039
- Grefhorst A, Elzinga BM, Voshol PJ, Plosch T, Kok T, Bloks VW, van der Sluijs FH, Havekes LM, Romijn JA, Verkade HJ, Kuipers F (2002) Stimulation of Lipogenesis by Pharmacological Activation of the Liver X Receptor Leads to Production of Large, Triglyceride-rich Very Low Density Lipoprotein Particles. *J. Biol. Chem.* 277:34182-34190
- Groschl M, Topf HG, Bohlender J, Zenk J, Klussmann S, Dotsch J, Rascher W, Rauh M (2005) Identification of Ghrelin in Human Saliva: Production by the Salivary Glands and Potential Role in Proliferation of Oral Keratinocytes. *Clin Chem* 51:997-1006
- Gualillo O, Caminos JE, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva FF (2001) Ghrelin, A Novel Placental-Derived Hormone. *Endocrinology* 142:788-794
- Guan H-P, Ishizuka T, Chui PC, Lehrke M, Lazar MA (2005) Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPAR γ in adipocytes. *Genes & Dev* 19:453-461
- Guan X-M, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJS, Smith RG, Van der Ploeg LHT, Howard AD (1997) Distribution of mRNA encoding the

- growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Mol Brain Res* 48:23-29
- Guillemin R, Brazeau P, Böhlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB (1982) Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 218:585-7
- Guthmann F, Haupt R, Looman AC, Spener F, Rustow B (1999) Fatty acid translocase/CD36 mediates the uptake of palmitate by type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 277:L191-196
- Han CY, Park SY, Pak YK (2000a) Role of endocytosis in the transactivation of nuclear factor-kappaB by oxidized low-density lipoprotein. *Biochem J* 350:829-837
- Han J, Hajjar DP, Tauras JM, Feng J, Gotto AM, Jr., Nicholson AC (2000b) Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) and TGF- β 2 Decrease Expression of CD36, the Type B Scavenger Receptor, through Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ . *J Biol Chem* 275:1241-1246
- Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connelly PA (1996) Discovery of a Novel, Potent, and Src Family-selective Tyrosine Kinase Inhibitor. *J Biol Chem* 271:695-701
- Hansson GK (2001) Immune Mechanisms in Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1876-1890
- Harb D, Bujold K, Febbraio M, Sirois MG, Ong H, Marleau S (2009) The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation. *Cardiovasc Res*:cvp081
- Hataya Y, Akamizu T, Takaya K, Kanamoto N, Ariyasu H, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2001) A Low Dose of Ghrelin Stimulates Growth Hormone (GH) Release Synergistically with GH-Releasing Hormone in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4552-
- Hatmi M, Gavaret J-M, Elalamy I, Vargaftig BB, Jacquemin C (1996) Evidence for cAMP-dependent Platelet Ectoprotein Kinase Activity That Phosphorylates Platelet Glycoprotein IV (CD36). *J Biol Chem* 271:24776-24780
- Hattori N (2009) Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. *Growth Horm IGF Res* 19:187-197
- Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang B-H, Kitagawa K, Inagaki C (2001) GH, GH Receptor, GH Secretagogue Receptor, and Ghrelin Expression in Human T Cells, B Cells, and Neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4284-4291
- Hauser S, Adelmant G, Sarraf P (2000) Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem* 275:18527-18533
- Hazen SL (2008) Oxidized Phospholipids as Endogenous Pattern Recognition Ligands in Innate Immunity. *J Biol Chem* 283:15527-15531
- Heinlein CA, Ting H-J, Yeh S, Chang C (1999) Identification of ARA70 as a Ligand-enhanced Coactivator for the Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma. *J. Biol. Chem.* 274:16147-16152

- Heller RS, Jenny M, Collombat P, Mansouri A, Tomasetto C, Madsen OD, Mellitzer G, Gradwohl G, Serup P (2005) Genetic determinants of pancreatic [epsilon]-cell development. *Dev Biol* 286:217-224
- Hennekens CH (1998) Increasing Burden of Cardiovascular Disease : Current Knowledge and Future Directions for Research on Risk Factors. *Circulation* 97:1095-1102
- Henriques-Coelho T, Roncon-Albuquerque Júnior R, Lourenço A, Baptista M, Oliveira S, Brandão-Nogueira A, Correia-Pinto J, Leite-Moreira A (2006) Ghrelin reverses molecular, structural and hemodynamic alterations of the right ventricle in pulmonary hypertension. *Rev Port Cardiol* 25:55-63
- Herrington J, Hille B (1994) Growth hormone-releasing hexapeptide elevates intracellular calcium in rat somatotropes by two mechanisms. *Endocrinology* 135:1100-1108
- Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425-479
- Hewson AK, Dickson SL (2000) Systemic Administration of Ghrelin Induces Fos and Egr-1 Proteins in the Hypothalamic Arcuate Nucleus of Fasted and Fed Rats. *J Neuroendocrinol* 12:1047-1049
- Hirakata M, Tozawa R, Imura Y, Sugiyama Y (2004) Comparison of the effects of pioglitazone and rosiglitazone on macrophage foam cell formation. *Biochem Biophys Res Commun* 323:782-788
- Ho M, Hoang HL, Lee KM, Liu N, MacRae T, Montes L, Flatt CL, Yipp BG, Berger BJ, Looareesuwan S, Robbins SM (2005) Ectophosphorylation of CD36 Regulates Cytoadherence of Plasmodium falciparum to Microvascular Endothelium under Flow Conditions *Infect Immun* 73:8179-8187
- Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zahringer U, Beutler B (2005) CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433:523-527
- Holliday ND, Holst B, Rodionova EA, Schwartz TW, Cox HM (2007) Importance of Constitutive Activity and Arrestin-Independent Mechanisms for Intracellular Trafficking of the Ghrelin Receptor. *Mol Endocrinol* 21:3100-3112
- Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW (2003) High Constitutive Signaling of the Ghrelin Receptor--Identification of a Potent Inverse Agonist. *Mol Endocrinol* 17:2201-2210
- Holst B, Holliday ND, Bach A, Elling CE, Cox HM, Schwartz TW (2004) Common Structural Basis for Constitutive Activity of the Ghrelin Receptor Family. *J Biol Chem* 279:53806-53817
- Holst B, Lang M, Brandt E, Bach A, Howard A, Frimurer TM, Beck-Sickinger A, Schwartz TW (2006) Ghrelin Receptor Inverse Agonists: Identification of an Active Peptide Core and Its Interaction Epitopes on the Receptor. *Mol Pharmacol* 70:936-946
- Holst B, Schwartz TW (2004) Constitutive ghrelin receptor activity as a signaling set-point in appetite regulation. *Trends Pharmacol Sci* 25:113-117
- Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, Rosenfeld MG (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377:397-404

- Hosoda H, Kojima 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 Communications* 279:909-913
- Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867
- Hou Z, Miao Y, Gao L, Pan H, Zhu S (2006) Ghrelin-containing neuron in cerebral cortex and hypothalamus linked with the DVC of brainstem in rat. *Regulatory Peptides* 134:126-131
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong S-S, Chaung L-Y, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJS, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LHT (1996) A Receptor in Pituitary and Hypothalamus That Functions in Growth Hormone Release. *Science* 273:974-977
- Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM (1996) Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ . *Science* 274:2100-2103
- Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK (1999) Interleukin-4-dependent production of PPAR- γ ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 400:378-382
- Huang MM, Bolen JB, Barnwell JW, Shattil SJ, Brugge JS (1991) Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:7844-7848
- Huh HY, Lo SK, Yesner LM, Silverstein RL (1995) CD36 Induction on Human Monocytes upon Adhesion to Tumor Necrosis Factor-activated Endothelial Cells. *J Biol Chem* 270:6267-6271
- Huh HY, Pearce SF, Yesner LM, Schindler JL, Silverstein RL (1996) Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood* 87:2020-2028
- Hummasti S, Tontonoz P (2006) The peroxisome proliferator-activated receptor N-terminal domain controls isotype-selective gene expression and adipogenesis. *Mol Endocrinol* 20:1261-1275
- Hutchinson DS, Summers RJ, Bengtsson T (2008) Regulation of AMP-activated protein kinase activity by G-protein coupled receptors: Potential utility in treatment of diabetes and heart disease. *Pharmacol Ther* 119:291-310
- Iantorno M, Chen H, Kim J-a, Tesauro M, Lauro D, Cardillo C, Quon MJ (2007) Ghrelin has novel vascular actions that mimic PI 3-kinase-dependent actions of insulin to stimulate production of NO from endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E756-764
- Ibrahimi A, Bonen A, Blinn WD, Hajri T, Li X, Zhong K, Cameron R, Abumrad NA (1999) Muscle-specific Overexpression of FAT/CD36 Enhances Fatty Acid Oxidation by Contracting Muscle, Reduces Plasma Triglycerides and Fatty Acids, and Increases Plasma Glucose and Insulin. *J. Biol. Chem.* 274:26761-26766

- Ikeda H, Mitani T, Ohnuma M, Haga H, Ohtzuka S, Kato T, Nakase T, Sekiguchi S (1989) A new platelet-specific antigen, Naka, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion. *Vox Sang* 57:213-217
- Imai M, Tanaka T, Kintaka T, Ikemoto T, Shimizu A, Kitaura Y (2002) Genomic heterogeneity of type II CD36 deficiency. *Clinica Chimica Acta* 321:97-106
- Ingelsson E, Larson MG, Yin X, Wang TJ, Meigs JB, Lipinska I, Benjamin EJ, Keaney JF, Jr., Vasan RS (2008) Circulating Ghrelin, Leptin, and Soluble Leptin Receptor Concentrations and Cardiometabolic Risk Factors in a Community-Based Sample. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3149-3157
- Issemann I, Green S (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-650
- Ito Y, Daitoku H, Fukamizu A (2009) Foxo1 increases pro-inflammatory gene expression by inducing C/EBP[β] in TNF-[α]-treated adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 378:290-295
- Ivashchenko CY, Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM (2007) PPAR- γ knockout in pancreatic epithelial cells abolishes the inhibitory effect of rosiglitazone on caerulein-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:G319-326
- Janabi M, Yamashita S, Hirano K-i, Sakai N, Hiraoka H, Matsumoto K, Zhang Z, Nozaki S, Matsuzawa Y (2000) Oxidized LDL-Induced NF- κ B Activation and Subsequent Expression of Proinflammatory Genes Are Defective in Monocyte-Derived Macrophages From CD36-Deficient Patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1953-1960
- Jeffery PL, Herington AC, Chopin LK (2002) Expression and action of the growth hormone releasing peptide ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines. *J Endocrinol* 172:R7-11
- Jiang H, Betancourt L, Smith RG (2006) Ghrelin Amplifies Dopamine Signaling by Cross Talk Involving Formation of Growth Hormone Secretagogue Receptor/Dopamine Receptor Subtype 1 Heterodimers. *Mol Endocrinol* 20:1772-1785
- Jiang H, Li L-J, Wang J, Xie J-X (2008) Ghrelin antagonizes MPTP-induced neurotoxicity to the dopaminergic neurons in mouse substantia nigra. *Experimental Neurology* 212:532-537
- Jiménez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N (2000) Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 6:41-48
- Juge-Aubry C, Pernin A, Favez T, Burger AG, Wahli W, Meier CA, Desvergne B (1997) DNA Binding Properties of Peroxisome Proliferator-activated Receptor Subtypes on Various Natural Peroxisome Proliferator Response Elements. Importance of the 5'-Flanking Region. *J Biol Chem* 272:25252-25259
- Kallenberger BC, Love JD, Krishna V, Chatterjee K, Schwabe JWR (2003) A dynamic mechanism of nuclear receptor activation and its perturbation in a human disease. *Nat Struct Biol* 10:136-140

- Kang NJ, Lee KW, Shin BJ, Jung SK, Hwang MK, Bode AM, Heo Y-S, Lee HJ, Dong Z (2009) Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis* 30:321-330
- Kar NS, Ashraf MZ, Valiyaveetil M, Podrez EA (2008) Mapping and Characterization of the Binding Site for Specific Oxidized Phospholipids and Oxidized Low Density Lipoprotein of Scavenger Receptor CD36. *J Biol Chem* 283:8765-8771
- Katsuki A, Urakawa H, Gabazza EC, Murashima S, Nakatani K, Togashi K, Yano Y, Adachi Y, Sumida Y (2004) Circulating levels of active ghrelin is associated with abdominal adiposity, hyperinsulinemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 151:573-577
- Katugampola SD, Pallikaros Z, Davenport AP (2001) Ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue; up-regulation of receptors with atherosclerosis. *British Journal of Pharmacology* 134:143-149
- Kelly D (2004) Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR γ and RelA. *Nature Immunol.* 5:104-112
- Kennedy MA, Venkateswaran A, Tarr PT, Xenarios I, Kudoh J, Shimizu N, Edwards PA (2001) Characterization of the Human ABCG1 Gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J Biol Chem* 276:39438-39447
- Kielian T, Drew PD (2003) Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists on central nervous system inflammation. *J Neurosci Res* 71:315-325
- Kilroy GE, Zhang X, Floyd ZE (2009) PPAR- γ AF-2 Domain Functions as a Component of a Ubiquitin-dependent Degradation Signal. *Obesity* 17:665-673
- Kim HG, Shrestha B, Lim SY, Yoon DH, Chang WC, Shin D-J, Han SK, Park SM, Park JH, Park HI, Sung J-M, Jang Y, Chung N, Hwang K-C, Kim TW (2006a) Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol* 545:192-199
- Kim JB, Spiegelman BM (1996) ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes & Dev* 10:1096-1107
- Kim KR, Lee JH, Kim SJ, Rhee SD, Jung WH, Yang S-D, Kim SS, Ahn JH, Cheon HG (2006b) KR-62980: A novel peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist with weak adipogenic effects. *Biochem Pharmacol* 72:446-454
- Kim MS, Yoon CY, Jang PG, Park YJ, Shin CS, Park HS, Ryu JW, Pak YK, Park JY, Lee KU, Kim SY, Lee HK, Kim YB, Park KS (2004) The Mitogenic and Antiapoptotic Actions of Ghrelin in 3T3-L1 Adipocytes. *Mol Endocrinol* 18:2291-2301
- Kim S-W, Park K, Kwak E, Choi E, Lee S, Ham J, Kang H, Kim JM, Hwang SY, Kong Y-Y, Lee K, Lee JW (2003) Activating Signal Cointegrator 2 Required for Liver Lipid Metabolism Mediated by Liver X Receptors in Mice. *Mol Cell Biol* 23:3583-3592
- Kintaka T, Tanaka T, Imai M, Adachi I, Narabayashi I, Kitaura Y (2002) CD36 Genotype and Long-Chain Fatty Acid Uptake in the Heart. *Circ J* 66:819-825

- Kleinz MJ, Maguire JJ, Skepper JN, Davenport AP (2006) Functional and immunocytochemical evidence for a role of ghrelin and des-octanoyl ghrelin in the regulation of vascular tone in man. *Cardiovasc Res* 69:227-235
- Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JrM (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4318-4323
- Kliwer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM (1992) Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 355:446-449
- Ko L, Cardona GR, Chin WW (2000) Thyroid hormone receptor-binding protein, an LXXLL motif-containing protein, functions as a general coactivator. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6212-6217
- Kohno D, Sone H, Minokoshi Y, Yada T (2008) Ghrelin raises $[Ca^{2+}]_i$ via AMPK in hypothalamic arcuate nucleus NPY neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 366:388-392
- Kojima M (2008) The discovery of ghrelin -- A personal memory. *Regul Pept* 145:2-6
- 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
- Kola B, Farkas I, Christ-Crain M, Wittmann G, Lolli F, Amin F, Harvey-White J, Liposits Z, Kunos G, Grossman AB, Fekete C, Korbonits aM (2008) The Orexigenic Effect of Ghrelin Is Mediated through Central Activation of the Endogenous Cannabinoid System. *PLoS ONE* 3:e1797
- Kola B, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, Garcia EA, Mitchell SE, Williams LM, Hawley SA, Hardie DG, Grossman AB, Korbonits M (2005) Cannabinoids and Ghrelin Have Both Central and Peripheral Metabolic and Cardiac Effects via AMP-activated Protein Kinase. *J Biol Chem* 280:25196-25201
- Kolak M, Yki-Jarvinen H, Kannisto K, Tiikkainen M, Hamsten A, Eriksson P, Fisher RM (2007) Effects of Chronic Rosiglitazone Therapy on Gene Expression in Human Adipose Tissue in Vivo in Patients with Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 92:720-724
- Koo GC, Huang C, Camacho R, Trainor C, Blake JT, Sirotina-Meisher A, Schleim KD, Wu T-J, Cheng K, Nargund R, McKissick G (2001) Immune Enhancing Effect of a Growth Hormone Secretagogue. *J Immunol* 166:4195-4201
- Koppen A, Houtman R, Pijnenburg D, Jenning EH, Ruijtenbeek R, Kalkhoven E (2009) Nuclear receptor-coregulator interaction profiling identifies TRIP3 as a novel PPARgamma cofactor. *Mol Cell Proteomics*:M900209-MCP200
- Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, Kangawa K, Grossman AB (2001) The Expression of the Growth Hormone Secretagogue Receptor Ligand Ghrelin in Normal and Abnormal Human Pituitary and Other Neuroendocrine Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86:881-887
- Korbonits Mr, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB (2004) Ghrelin--a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 25:27-68

- Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Nagai R, Tobe K, Kimura S, Kadowaki T (1999) PPAR γ Mediates High-Fat Diet Induced Adipocyte Hypertrophy and Insulin Resistance. *4:597-609*
- Kuchibhotla S, Vanegas D, Kennedy DJ, Guy E, Nimako G, Morton RE, Febbraio M (2008) Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res 78:185-196*
- Kunin M, Simons BL, Irrazabal C, Shen R-F, Wang G, Burg MB, Ferraris JD (2008) LC-MS/MS identification of amino acids that are phosphorylated in the osmoprotective transcription factor, TonEBP/OREBP. *FASEB J. 22:933.7-*
- Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, Freeman MW (2002) Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem 277:49982*
- Kushiro T, Saito F, Kusama J, Takahashi H, Imazeki T, Tani S, Kikuchi S, Imai S, Matsudaira K, Watanabe I, Hino T, Sato Y, Nakayama T, Nagao K, Kanmatsuse K (2005) Takotsubo-shaped cardiomyopathy with type I CD36 deficiency. *Heart and Vessels 20:123-125*
- Kuwasako T, Hirano K-i, Sakai N, Ishigami M, Hiraoka H, Yakub MJ, Yamauchi-Takihara K, Yamashita S, Matsuzawa Y (2003) Lipoprotein Abnormalities in Human Genetic CD36 Deficiency Associated With Insulin Resistance and Abnormal Fatty Acid Metabolism. *Diabetes Care 26:1647-a-1648*
- Kwapiszewska G, Wilhelm J, Wolff S, Laumanns I, Koenig I, Ziegler A, Seeger W, Bohle R, Weissmann N, Fink L (2005) Expression profiling of laser-microdissected intrapulmonary arteries in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respir Res 6:109*
- Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P (2001) LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98:507-512*
- Lai P-H, Wang W-L, Ko C-Y, Lee Y-C, Yang W-M, Shen T-W, Chang W-C, Wang J-M (2008) HDAC1/HDAC3 modulates PPAR γ 2 transcription through the sumoylated CEBPD in hepatic lipogenesis. *Biochim Biophys Acta 1783:1803-1814*
- Langenberg C, Bergstrom J, Laughlin GA, Barrett-Connor E (2005) Ghrelin and the Metabolic Syndrome in Older Adults. *J Clin Endocrinol Metab 90:6448-6453*
- Laudet V, Hänni C, Coll J, Catzeflis F, Stéhelin D (1992) Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J 11:1003-1013*
- Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot s, Febbraio M, Montmayeur J-P, Besnard P (2005) CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest 115:3177-3184*

- Lee C-C, Lee R-P, Subeq Y-M, Wang C-H, Fang T-C, Hsu B-G (2008) Fasting Serum Total Ghrelin Level Inversely Correlates with Metabolic Syndrome in Hemodialysis Patients. *Arch Med Res* 39:785-790
- Lee KS, Park SJ, Kim SR, Min KH, Jin SM, Lee HK, Lee YC (2006) Modulation of Airway Remodeling and Airway Inflammation by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in a Murine Model of Toluene Diisocyanate-Induced Asthma. *J Immunol* 177:5248-5257
- Lee S-K, Anzick SL, Choi J-E, Bubendorf L, Guan X-Y, Jung Y-K, Kallioniemi OP, Kononen J, Trent JM, Azorsa D, Jhun B-H, Cheong JH, Lee YC, Meltzer PS, Lee JW (1999) A Nuclear Factor, ASC-2, as a Cancer-amplified Transcriptional Coactivator Essential for Ligand-dependent Transactivation by Nuclear Receptors in Vivo. *J Biol Chem* 274:34283-34293
- Leff T (2003) AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochem Soc Trans* 31:224-227
- Lehmann JM (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J Biol Chem* 270:12953-12956
- Leibowitz MD, Ardecky RJ, Boehm MF, Broderick CL, Carfagna MA, Crombie DL, D'Arrigo J, Etgen GJ, Faul MM, Grese TA, Havel H, Hein NI, Heyman RA, Jolley D, Klausning K, Liu S, Mais DE, Mapes CM, Marschke KB, Michellys P-Y, Montrose-Rafizadeh C, Ogilvie KM, Pascual B, Rungta D, Tyhonas JS, Urcan MS, Wardlow M, Yumibe N, Reifel-Miller A (2006) Biological Characterization of a Heterodimer-Selective Retinoid X Receptor Modulator: Potential Benefits for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Endocrinology* 147:1044-1053
- Leidi M, Mariotti M, Maier J (2009) Transcriptional coactivator EDF-1 is required for PPAR γ -stimulated adipogenesis. *Cell Mol Life Sci* 66:2733-2742
- Leprêtre F, Linton K, Lacquemant C, Vatin V, Samson C, Dina C, Chikri M, Ali S, Scherer P, Séron K, Vasseur F, Aitman T, Froguel P (2004) Genetic study of the CD36 gene in a French diabetic population. *Diabetes & Metabolism* 30:459-463
- Leung P-K, Chow KBS, Lau P-N, Chu K-M, Chan C-B, Cheng CHK, Wise H (2007) The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor. *Cell Signal* 19:1011-1022
- Li A (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 106:523-531
- Li A, Brown K, Silvestre M, Willson T, Palinski W, Glass C (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 106:523-531
- Li A, Cheng G, Zhu Gh, Tarnawski AS (2007) Ghrelin stimulates angiogenesis in human microvascular endothelial cells: Implications beyond GH release. *Biochem Biophys Res Commun* 353:238-243
- Li WG, Gavrilu D, Liu X, Wang L, Gunnlaugsson S, Stoll LL, McCormick ML, Sigmund CD, Tang C, Weintraub NL (2004) Ghrelin Inhibits Proinflammatory Responses

- and Nuclear Factor- κ B Activation in Human Endothelial Cells. *Circulation* 109:2221-2226
- Li Y, Wang Z, Furukawa N, Escaron P, Weiszmann J, Lee G, Lindstrom M, Liu J, Liu X, Xu H, Plotnikova O, Prasad V, Walker N, Learned RM, Chen J-L (2008) T2384, a Novel Antidiabetic Agent with Unique Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Binding Properties. *J Biol Chem* 283:9168-9176
- Liebmann C (2001) Bradykinin Signalling to MAP Kinase: Cell-Specific Connections versus Principle Mitogenic Pathways. *Biol Chem* 382:49-55
- Lim H-J, Lee S, Lee K-S, Park J-H, Jang Y, Lee EJ, Park H-Y (2006) PPAR γ activation induces CD36 expression and stimulates foam cell like changes in rVSMCs. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 80:165-174
- Lin Y, Matsumura K, Fukuhara M, Kagiya S, Fujii K, Iida M (2004) Ghrelin Acts at the Nucleus of the Solitary Tract to Decrease Arterial Pressure in Rats. *Hypertension* 43:977-982
- Lipsky R, Eckert D, Tang Y, Ockenhouse C (1997) The carboxyl-terminal cytoplasmic domain of CD36 is required for oxidized low-density lipoprotein modulation of NF- κ B activity by tumor necrosis factor- α . *Recept Signal Transduct* 7:1-11
- Llaverias G, Rebollo A, Pou J, V-zquez-Carrera M, S-nchez RM, Laguna JC, Alegret M (2006) Effects of rosiglitazone and atorvastatin on the expression of genes that control cholesterol homeostasis in differentiating monocytes. *Biochem Pharmacol* 71:605-614
- Lodeiro M, Theodoropoulou M, Pardo M, Casanueva FF, Camiña JP (2009) c-Src Regulates Akt Signaling in Response to Ghrelin via β -Arrestin Signaling-Independent and -Dependent Mechanisms. *PLoS ONE* 4:e4686
- Loppnow H, Werdan K, Buerke M (2008) Invited review: Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine- and innate-immunity-related inflammatory mechanisms. *Innate Immunity* 14:63-87
- Love-Gregory L, Sherva R, Sun L, Wasson J, Schappe T, Doria A, Rao DC, Hunt SC, Klein S, Neuman RJ, Permutt MA, Abumrad NA (2008) Variants in the CD36 gene associate with the metabolic syndrome and high-density lipoprotein cholesterol. *Hum. Mol. Genet.* 17:1695-1704
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117:175-184
- Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002) The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115:455-465
- Maccarinelli G, Sibilina V, Torsello A, Raimondo F, Pitto M, Giustina A, Netti C, Cocchi D (2005) Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *J Endocrinol* 184:249-256
- Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy J-Y, Pober JS, Libby P (1997) Activation of Monocyte/Macrophage Functions Related to Acute Atheroma Complication by Ligation of CD40 : Induction of Collagenase, Stromelysin, and Tissue Factor. *Circulation* 96:396-399

- Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y (2001) PPAR γ Ligands Increase Expression and Plasma Concentrations of Adiponectin, an Adipose-Derived Protein. *Diabetes* 50:2094-2099
- Mahley RW (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240:622-30
- Mak PA, Laffitte BA, Desrumaux C, Joseph SB, Curtiss LK, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P, Edwards PA (2002) Regulated Expression of the Apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II Gene Cluster in Murine and Human Macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors α and β . *J Biol Chem* 277:31900-31908
- Malagon MM, Luque RM, Ruiz-Guerrero E, Rodriguez-Pacheco F, Garcia-Navarro S, Casanueva FF, Gracia-Navarro F, Castano JP (2003) Intracellular Signaling Mechanisms Mediating Ghrelin-Stimulated Growth Hormone Release in Somatotropes. *Endocrinology* 144:5372-5380
- Malaud E, Hourton D, Giroux LM, Ninio E, Buckland R, McGregor JL (2002) The terminal six amino-acids of the carboxy cytoplasmic tail of CD36 contain a functional domain implicated in the binding and capture of oxidized low-density lipoprotein. *Biochem J* 364:507-515
- Marleau S, Harb D, Bujold K, Avallone R, Iken K, Wang Y, Demers A, Sirois MG, Febbraio M, Silverstein RL, Tremblay A, Ong H (2005) EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *FASEB J.* 19:1869-1871
- Marleau S, Mulumba M, Lamontagne D, Ong H (2006) Cardiac and peripheral actions of growth hormone and its releasing peptides: Relevance for the treatment of cardiomyopathies. *Cardiovasc Res* 69:26-35
- Martin G, Poirier H, Hennuyer N (2000) Induction of the fatty acid transport protein 1 and acyl-CoA synthase genes by dimer-selective rexinoids suggests that the peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimer is their molecular target. *J Biol Chem* 275:12612-12618
- Masuda D, Hirano K-i, Oku H, Sandoval JC, Kawase R, Yuasa-Kawase M, Yamashita Y, Takada M, Tsubakio-Yamamoto K, Tochino Y, Koseki M, Matsuura F, Nishida M, Kawamoto T, Ishigami M, Hori M, Shimomura I, Yamashita S (2008) Chylomicron remnants are increased in the postprandial state in CD36 deficiency. *J. Lipid Res.*:P700032-JLR200
- Mau SE, Witt MR, Bjerrum OJ, Saermark T, Vilhardt H (1995) Growth hormone releasing hexapeptide (GHRP-6) activates the inositol (1,4,5)-trisphosphate/diacylglycerol pathway in rat anterior pituitary cells. *J Recept Signal Transduct Res.* 15:311-23
- Mazzocchi G, Neri G, Rucinski M, Rebuffat P, Spinazzi R, Malendowicz LK, Nussdorfer GG (2004) Ghrelin enhances the growth of cultured human adrenal zona glomerulosa cells by exerting MAPK-mediated proliferogenic and antiapoptotic effects. *Peptides* 25:1269-1277

- McKee KK, Tan CP, Palyha OC, Liu J, Feighner SD, Hreniuk DL, Smith RG, Howard AD, Van der Ploeg LHT (1997) Cloning and Characterization of Two Human G Protein-Coupled Receptor Genes (GPR38 and GPR39) Related to the Growth Hormone Secretagogue and Neurotensin Receptors. *Genomics* 46:426-434
- Meloche S, Pouyssegur J The ERK1//2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26:3227-3239
- Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Fiorucci S (2009) Antiatherosclerotic effect of farnesoid X receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296:H272-281
- Michael BD, Norbert Lg, Lars E, Martin FK (2001) Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 120:49-59
- Mikita T, Porter G, Lawn RM, Shiffman D (2001) Oxidized Low Density Lipoprotein Exposure Alters the Transcriptional Response of Macrophages to Inflammatory Stimulus. *J Biol Chem* 276:45729-45739
- Miles PD, Barak Y, He W, Evans RM, Olefsky JM (2000) Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR- γ deficiency. *J. Clin. Invest.* 105:287
- Minamikawa J, Tanaka S, Yamauchi M, Inoue D, Koshiyama H (1998) Potent Inhibitory Effect of Troglitazone on Carotid Arterial Wall Thickness in Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1818-
- Miyaoka K, Kuwasako T, Hirano K-i, Nozaki S, Yamashita S, Matsuzawa Y (2001) CD36 deficiency associated with insulin resistance. *The Lancet* 357:686-687
- Miyata K, McCaw S, Marcus S, Rachubinski R, Capone J (1994) The peroxisome proliferator-activated receptor interacts with the retinoid X receptor in vivo. *Gene* 148:327-330
- Mladenov MI, Hristov KL, Dimitrova DZ, Schubert R, Lubomirov LT, Gjorgoski IK, Duridanova DB, Gagov HS (2008) Ghrelin signalling in guinea-pig femoral artery smooth muscle cells. *Acta Physiologica* 194:195-206
- Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Hong A, Newlander K (1984) Conformational energy studies and in vitro and in vivo activity data on growth hormone-releasing peptides. *Endocrinology* 114:1531-6
- Moore KJ, El Khoury J, Medeiros LA, Terada K, Geula C, Luster AD, Freeman MW (2002) A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J. Biol. Chem.* 277:47373
- Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasu H, Yahata K, Mukoyama M, Sugawara A, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2000) Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Letters* 486:213-216
- Muccioli G, Pons N, Ghè C, Catapano F, Granata R, Ghigo E (2004) Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol* 498:27-35
- Muccioli G, Tschöp M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M, Ghigo E (2002) Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol* 440:235-254

- Mukherjee R, Davies PAJ, Crombie DL, Bischoff ED, Cesario RM (1997) Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* 386:407
- Munteanu A, Taddei M, Tamburini I, Bergamini E, Azzi A, Zingg J-M (2006) Antagonistic Effects of Oxidized Low Density Lipoprotein and α -Tocopherol on CD36 Scavenger Receptor Expression in Monocytes: involvement of protein kinase B and peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *J Biol Chem* 281:6489-6497
- Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K (2002) Ghrelin Modulates the Downstream Molecules of Insulin Signaling in Hepatoma Cells. *J Biol Chem* 277:5667-5674
- Muscat GE, Burke LJ, Downes M (1998) The corepressor N-CoR and its variants RIP13a and RIP13Delta1 directly interact with the basal transcription factors TFIIB, TAFII32 and TAFII70. *Nucleic Acids Res* 26:2899-2907
- Mwaikambo BR, Yang C, Chemtob S, Hardy P (2009) Hypoxia Up-regulates CD36 Expression and Function via Hypoxia-inducible Factor-1- and Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Mechanisms. *J Biol Chem* 284:26695-26707
- Nagaya N, Kangawa K (2003) Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure. *Curr Opin Pharmacol* 3:146-151
- Nagaya N, Kangawa K (2006) Therapeutic potential of ghrelin in the treatment of heart failure. *Drugs* 66:439-448
- Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, Hayashi Y, Kangawa K (2001) Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R1483-1487
- Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y, Uematsu M, Ono F, Shimizu W, Ueno K, Kitakaze M, Miyatake K, Kangawa K (2004) Effects of Ghrelin Administration on Left Ventricular Function, Exercise Capacity, and Muscle Wasting in Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation* 110:3674-3679
- Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JGA, Chen H, Evans RM (1998) Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell* 93:229-240
- 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* 409:194-198
- Nanzer AM, Khalaf S, Mozid AM, Fowkes RC, Patel MV, Burrin JM, Grossman AB, Korbonits M (2004) Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Endocrinol* 151:233-240
- Naoki T, Ayano H, Tadashi K, Naoko U, Yuka M, Daisuke N, Toshimori I (2003) T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Lett* 536:6-11
- Navazo MDP, Daviet L, Ninio E, McGregor JL (1996a) Identification on Human CD36 of a Domain (155-183) Implicated in Binding Oxidized Low-Density Lipoproteins (Ox-LDL). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1033-1039
- Navazo MDP, Daviet L, Savill J, Ren Y, Leung LLK, McGregor JL (1996b) Identification of a Domain (155-183) on CD36 Implicated in the Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils. *J Biol Chem* 271:15381-15385

- Neary NM, Small CJ, Wren AM, Lee JL, Druce MR, Palmieri C, Frost GS, Ghatei MA, Coombes RC, Bloom SR (2004) Ghrelin Increases Energy Intake in Cancer Patients with Impaired Appetite: Acute, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2832-2836
- Neels JG, Olefsky JM (2006) Inflamed fat: what starts the fire? *J Clin Invest* 116:33-35
- Nicholson AC, Febbraio M, Han J, Silverstein RL, Hajjar DP (2000) CD36 in Atherosclerosis: The Role of a Class B Macrophage Scavenger Receptor. *Ann N Y Acad Sci* 902:128-133
- Nicholson AC, Frieda S, Pearce A, Silverstein RL (1995) Oxidized LDL Binds to CD36 on Human Monocyte-Derived Macrophages and Transfected Cell Lines : Evidence Implicating the Lipid Moiety of the Lipoprotein as the Binding Site. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15:269-275
- Nishizawa H, Yamagata K, Shimomura I, Takahashi M, Kuriyama H, Kishida K, Hotta K, Nagaretani H, Maeda N, Matsuda M, Kihara S, Nakamura T, Nishigori H, Tomura H, Moore DD, Takeda J, Funahashi T, Matsuzawa Y (2002) Small Heterodimer Partner, an Orphan Nuclear Receptor, Augments Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Transactivation. *Journal of Biological Chemistry* 277:1586-1592
- Nolan JJ, Ludvik B, Beerdsen P, Joyce M, Olefsky J (1994) Improvement in Glucose Tolerance and Insulin Resistance in Obese Subjects Treated with Troglitazone. *N Engl J Med* 331:1188-1193
- Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-[γ]. *Nature* 395:137-143
- Nozaki S, Kashiwagi H, Yamashita S, Nakagawa T, Kostner B, Tomiyama Y, Nakata A, Ishigami M, Miyagawa J, Kameda-Takemura K (1995) Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J Clin Invest* 96:1859-1865
- NuclearReceptorsNomenclatureCommittee (1999) A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell* 97:161-163
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (1999) Association of beta - Arrestin with G Protein-coupled Receptors during Clathrin-mediated Endocytosis Dictates the Profile of Receptor Resensitization. *J. Biol. Chem.* 274:32248-32257
- Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Eagle AR, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A (2007) Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447:1116-1120
- Ogawa S (2005) Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and Toll-like receptors. *Cell* 122:707-21
- Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H (2001) CD36, a Member of the Class B Scavenger Receptor Family, as a Receptor for Advanced Glycation End Products. *J. Biol. Chem.* 276:3195-3202

- Ohshima T, Koga H, Shimotohno K (2004) Transcriptional Activity of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Is Modulated by SUMO-1 Modification. *J. Biol. Chem.* 279:29551-29557
- Okumura H, Nagaya N, Enomoto M, Nakagawa E, Oya H, Kangawa K (2002) Vasodilatory Effect of Ghrelin, an Endogenous Peptide From the Stomach. *J Cardiovasc Pharmacol* 39:779-783
- Olswang Y, Cohen H, Papo O (2002) A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose tissue size and fat content in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:625-630
- Ott V, Fasshauer M, Dalski A, Meier B, Perwitz N, Klein HH, Tschöp M, Klein J (2002) Direct Peripheral Effects of Ghrelin Include Suppression of Adiponectin Expression. *Horm Metab Res* 34:640-645
- Ouwens DM, Diamant M, Fodor M, Habets DDJ, Pelsers MMAL, Hasnaoui ME, Dang ZC, Brom CEvd, Vlasblom R, Rietdijk A, Boer C, Coort SLM, Glatz JFC, Luiken JJFP (2007) Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD36-mediated fatty acid uptake and esterification. *Diabetologia* 50:1938-1948
- Palmer CNA, Hsu M-H, Griffin KJ, Johnson EF (1995) Novel Sequence Determinants in Peroxisome Proliferator Signaling. *J Biol Chem* 270:16114-16121
- Palyha OC, Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Hreniuk DL, Gao Y-D, Schleim KD, Yang L, Morriello GJ, Nargund R, Patchett AA, Howard AD, Smith RG (2000) Ligand Activation Domain of Human Orphan Growth Hormone (GH) Secretagogue Receptor (GHS-R) Conserved from Pufferfish to Humans. *Mol Endocrinol* 14:160-169
- Pantel J, Legendre M, Cabrol S, Hilal L, Hajaji Y, Morisset S, Nivot S, Vie-Luton M-P, Grouselle D, Kerdanet Md, Kadiri A, Epelbaum J, Bouc YL, Amselem aS (2006) Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest* 116:760-768
- Paola L, Giuseppe M, Chiara Di L, Natascia P, Arianna De C, Cristina F, Chiara T, Carmine F, Fabio B, Ezio G, Geremia BB, Fausto S, Pierpaolo De F (2005) Metabolic and endocrine effects of physiological increments in plasma ghrelin concentrations. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 15:410-417
- Papotti M, Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G (2000) Growth Hormone Secretagogue Binding Sites in Peripheral Human Tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3803-3807
- Park YM, Febbraio M, Silverstein RL (2008) CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest* 119:136-45
- Pascual G, Fong A, Ogawa S, Gamliel A, Li A, Perissi V, Rose D, Willson T, Rosenfeld M, Glass C (2005) A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR γ . *Nature* 437:759-763

- Patchett AA, Nargund RP, Tata JR, Chen MH, Barakat KJ, Johnston DB, Cheng K, Chan WW, Butler B, Hickey G, et al (1995) Design and biological activities of L-163,191 (MK-0677): a potent, orally active growth hormone secretagogue. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7001-7005
- Pearce SFA, Roy P, Nicholson AC, Hajjar DP, Febbraio M, Silverstein RL (1998) Recombinant Glutathione S-Transferase/CD36 Fusion Proteins Define an Oxidized Low Density Lipoprotein-binding Domain. *J. Biol. Chem.* 273:34875-34881
- Pendse AA, Arbones-Mainar JM, Johnson LA, Altenburg MK, Maeda N (2009) Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. *J Lipid Res* 50:S178-182
- Peng D, Hiipakka RA, Dai Q, Guo J, Reardon CA, Getz GS, Liao S (2008) Antiatherosclerotic Effects of a Novel Synthetic Tissue-Selective Steroidal Liver X Receptor Agonist in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 327:332-342
- Perlmann T, Jansson L (1995) A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes & Development* 9:769-782
- Petri TK, Markku OPi (2003) Pharmacological evidence for a role of liver X receptors in atheroprotection. *FEBS letters* 536:3-5
- Pierno S, Luca AD, Desaphy J-F, Fraysse B, Liantonio A, Didonna MP, Lograno M, Cocchi D, Smith RG, Camerino DC (2003) Growth hormone secretagogues modulate the electrical and contractile properties of rat skeletal muscle through a ghrelin-specific receptor. *Br J Pharmacol* 139:575-584
- Pietsch A, Erl W, Lorenz RL (1996) Lovastatin reduces expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells. *Biochemical Pharmacology* 52:433-439
- Podrez EA, Hoppe G, O'Neil J, Hoff HF (2003) Phospholipids in oxidized LDL not adducted to apoB are recognized by the CD36 scavenger receptor. *Free Radic Biol Med* 34:356-364
- Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, Finton PJ, Shan L, Gugiu B, Fox PL, Hoff HF, Salomon RG, Hazen SL (2002) Identification of a Novel Family of Oxidized Phospholipids That Serve as Ligands for the Macrophage Scavenger Receptor CD36. *J Biol Chem* 277:38503-38516
- Popovic V, Miljic D, Micic D, Damjanovic S, Arvat E, Ghigo E, Dieguez C, Casanueva FF (2003) Ghrelin Main Action on the Regulation of Growth Hormone Release Is Exerted at Hypothalamic Level. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3450-3453
- Poykko SM, Kellokoski E, Horkko S, Kauma H, Kesaniemi YA, Ukkola O (2003) Low Plasma Ghrelin Is Associated With Insulin Resistance, Hypertension, and the Prevalence of Type 2 Diabetes. *Diabetes* 52:2546-2553
- Prieto J, Eklund A, Patarroyo M (1994) Regulated Expression of Integrins and Other Adhesion Molecules during Differentiation of Monocytes into Macrophages. *Cell Immunol* 156:191-211

- Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang C-Y, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM (2001) Cytokine Stimulation of Energy Expenditure through p38 MAP Kinase Activation of PPAR γ Coactivator-1. *Mol Cell* 8:971-982
- Puigserver P, Spiegelman BM (2003) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator 1 α (PGC-1 α): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator. *Endocr Rev* 24:78-90
- Pusztai P, Sarman B, Ruzicska E, Toke J, Racz K, Somogyi A, Tulassay Z (2008) Ghrelin: a new peptide regulating the neurohormonal system, energy homeostasis and glucose metabolism. *Diabetes Metab Res Rev* 24:343-352
- Qi C, Surapureddi S, Zhu Y-J, Yu S, Kashireddy P, Rao MS, Reddy JK (2003) Transcriptional Coactivator PRIP, the Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ)-interacting Protein, Is Required for PPAR γ -mediated Adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 278:25281-25284
- Qiao L, Zou C, Shao P, Schaack J, Johnson PF, Shao J (2008) Transcriptional Regulation of Fatty Acid Translocase/CD36 Expression by CCAAT/Enhancer-binding Protein α . *Journal of Biological Chemistry* 283:8788-8795
- Rahaman SO, Lennon DJ, Febbraio M, Podrez EA, Hazen SL, Silverstein RL (2006) A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab* 4:211-221
- Ranganathan G, Unal R, Pokrovskaya I (2006) The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *J Lipid Res* 47:2444-2450
- Rangwala SM, Rhoades B, Shapiro JS, Rich AS, Kim JK, Shulman GI, Kaestner KH, Lazar MA (2003) Genetic Modulation of PPAR γ Phosphorylation Regulates Insulin Sensitivity. *5:657-663*
- Reape TJ, Groot PHE (1999) Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 147:213-225
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391:79-82
- Riediger T, Traebert M, Schmid HA, Scheel C, Lutz TA, Scharrer E (2003) Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 341:151-155
- Rieusset J, Touri F, Michalik L (2002) A new selective peroxisome proliferator-activated receptor γ antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol Endocrinol* 16:2628-2644
- Ring A, Le Lay S, Pohl J, Verkade P, Stremmel W (2006) Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1761:416-423
- Riserus U, Tan GD, Fielding BA (2005) Rosiglitazone increases indexes of stearoyl-CoA desaturase activity in humans: link to insulin sensitization and the role of dominant-negative mutation in peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Diabetes* 54:1379-1384

- Rocchi S, Picard F, Vamecq J, Gelman L, Potier N (2001) A unique PPAR γ ligand with potent insulin-sensitizing yet weak adipogenic activity. *Mol. Cell.* 8:737
- Rodriguez-Pacheco F, Luque RM, Tena-Sempere M, Malagòn MM, Castano JP (2008) Ghrelin Induces Growth Hormone Secretion Via a Nitric Oxide /cGMP Signalling Pathway. *J Neuroendocrinol* 20:406-412
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM (1999) PPAR γ Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro. *Mol Cell* 4:611-617
- Rossi F, Bertone C, Petricca S, Santiemma V (2007) Ghrelin inhibits angiotensin II-induced migration of human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 192:291-297
- Rossi F, Castelli A, Bianco MJ, Bertone C, Brama M, Santiemma V (2008) Ghrelin induces proliferation in human aortic endothelial cells via ERK1/2 and PI3K/Akt activation. *Peptides* 29:2046-2051
- Rossi F, Castelli A, Bianco MJ, Bertone C, Brama M, Santiemma V (2009) Ghrelin inhibits contraction and proliferation of human aortic smooth muscle cells by cAMP/PKA pathway activation. *Atherosclerosis* 203:97-104
- Rowan BG, Garrison N, Weigel NL, O'Malley BW (2000) 8-Bromo-Cyclic AMP Induces Phosphorylation of Two Sites in SRC-1 That Facilitate Ligand-Independent Activation of the Chicken Progesterone Receptor and Are Critical for Functional Cooperation between SRC-1 and CREB Binding Protein. *Mol Cell Biol* 20:8720-8730
- Rozengurt E (1998) Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists. *Journal of Cellular Physiology* 177:507-517
- Rubic T, Lorenz RL (2006) Downregulated CD36 and oxLDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as anti-atherosclerotic mechanisms of interleukin-10. *Cardiovasc Res* 69:527-535
- Ryeom SW, Sparrow JR, Silverstein RL (1996) CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *J Cell Sci* 109:387-395
- Saitoh M, Takayanagi R, Goto K, Fukamizu A, Tomura A, Yanase T, Nawata H (2002) The Presence of Both the Amino- and Carboxyl-Terminal Domains in the AR Is Essential for the Completion of a Transcriptionally Active Form with Coactivators and Intranuclear Compartmentalization Common to the Steroid Hormone Receptors: A Three-Dimensional Imaging Study. *Mol Endocrinol* 16:694-706
- Salehi A, Dornonville de la Cour C, Håkanson R, Lundquist I (2004) Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. *Regulatory Peptides* 118:143-150
- Sampson MJ, Davies IR, Braschi S, Ivory K, Hughes DA (2003) Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 167:129-134
- Sanchez M, Sauve K, Picard N, Tremblay A (2007) The Hormonal Response of Estrogen Receptor beta Is Decreased by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway via a Phosphorylation-dependent Release of CREB-binding Protein. *J. Biol. Chem.* 282:4830-4840

- Sang Wan K, Sun Ju H, Seong Jae P, Dohee K, Kyong Soo P, Hong Kyu L, Byung Hee H, Min Seon K, Chan Soo S, Seong Yeon K (2005) Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone* 37:359-369
- Sano M, Tokudome S, Shimizu N, Yoshikawa N, Ogawa C, Shirakawa K, Endo J, Katayama T, Yuasa S, Ieda M, Makino S, Hattori F, Tanaka H, Fukuda K (2007) Intramolecular Control of Protein Stability, Subnuclear Compartmentalization, and Coactivator Function of Peroxisome Proliferator-activated Receptor $\{\gamma\}$ Coactivator 1 $\{\alpha\}$. *J Biol Chem* 282:25970-25980
- Sartin JL, Coleman ES, Steele B (1996) Interaction of cyclic AMP- and calcium-dependent mechanisms in the regulation of growth hormone-releasing hormone-stimulated growth hormone release from ovine pituitary cells. *Domestic animal endocrinology* 13:229-238
- Sato O, Kuriki C, Fukui Y, Motojima K (2002) Dual Promoter Structure of Mouse and Human Fatty Acid Translocase/CD36 Genes and Unique Transcriptional Activation by Peroxisome Proliferator-activated Receptor α and γ Ligands. *J. Biol. Chem.* 277:15703-15711
- Sato O, Takanashi N, Motojima K (2007) Third promoter and differential regulation of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 299:37-43
- Savill J, Hogg N, Haslett C (1991) Macrophage vitronectin receptor, CD36, and thrombospondin cooperate in recognition of neutrophils undergoing programmed cell death. *Chest* 99:6S-7S
- Schachtrup CET, Bleck B, Sandqvist A, Spener F (2004) Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins. *Biochem J* 382:239-245
- Schock SC, Xu J, Duquette PM, Qin Z, Lewandowski AJ, Rai PS, Thompson CS, Seifert EL, Harper M-E, Chen H-H (2008) Rescue of Neurons from Ischemic Injury by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Requires a Novel Essential Cofactor LMO4. *J. Neurosci.* 28:12433-12444
- Schonwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ (1998) Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway by Conventional, Novel, and Atypical Protein Kinase C Isoforms. *Mol Cell Biol* 18:790-798
- Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman R, Briggs M (1996) PPAR α and PPAR γ activators direct a tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15:5336
- Schulman IG, Shao G, Heyman RA (1998) Transactivation by retinoid X receptor peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) heterodimers: Intermolecular synergy requires only the PPAR γ hormone-dependent activation function. *Mol Cell Biol* 18:3483-3494

- Schwartz TW, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, Elling CE (2006) Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 46:481-519
- Senthil Kumar V, Sridevi D, Ishwarlal J (2004) RRR- α -tocopherol decreases the expression of the major scavenger receptor, CD36, in human macrophages via inhibition of tyrosine kinase (Tyk2). *Atherosclerosis* 175:213-220
- Serghides L, Smith TG, Patel SN, Kain KC (2003) CD36 and malaria: friends or foes? *Trends in Parasitology* 19:461-469
- Shafton AD, Sanger GJ, Witherington J, Brown JD, Muir A, Butler S, Abberley L, Shimizu Y, Furness JB (2009) Oral administration of a centrally acting ghrelin receptor agonist to conscious rats triggers defecation. *Neurogastroenterol Motil* 21:71-77
- Shah PK (1998) Role of inflammation and metalloproteinases in plaque disruption and thrombosis. *Vascular Medicine* 3:199-206
- Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA (1998) Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR- γ . *Nature* 396:377-380
- Shen F, Li N, Gade P, Kalvakolanu D, Weibley T, Doble B, Woodgett J, Wood T, Gaffen S (2009) IL-17 receptor signaling inhibits C/EBP β by sequential phosphorylation of the regulatory 2 domain. *Sci Signal* 2:ra8
- Shibuya A, Wada K, Nakajima A, Saeki M, Katayama K, Mayumi T, Kadowaki T, Niwa H, Kamisaki Y (2002) Nitration of PPAR γ inhibits ligand-dependent translocation into the nucleus in a macrophage-like cell line, RAW 264. *FEBS Letters* 525:43-47
- Shimizu Y, Chang EC, Shafton AD, Dorota M Ferens, Sanger GJ, Witherington J, Furness JB (2006) Evidence that stimulation of ghrelin receptors in the spinal cord initiates propulsive activity in the colon of the rat. *J Physiol* 576:329-338
- Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T, Imazu M, Okumura H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Kohno N (2003a) Increased Plasma Ghrelin Level in Lung Cancer Cachexia. *Clin Cancer Res* 9:774-778
- Shimizu Y, Nagaya N, Teranishi Y, Imazu M, Yamamoto H, Shokawa T, Kangawa K, Kohno N, Yoshizumi M (2003b) Ghrelin improves endothelial dysfunction through growth hormone-independent mechanisms in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 310:830-835
- 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
- Shiojiri T, Wada K, Nakajima A, Katayama K, Shibuya A, Kudo C, Kadowaki T, Mayumi T, Yura Y, Kamisaki Y (2002) PPAR γ ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice. *Eur J Pharmacol* 448:231-238
- Shrivastava N, Srivastava A (2008) RNA interference: An emerging generation of biologicals. *Biotechnol J* 3:339-353

- Shuto Y, Shibasaki T, Wada K, Parhar I, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I (2001) Generation of polyclonal antiserum against the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R): Evidence that the GHS-R exists in the hypothalamus, pituitary and stomach of rats. *Life Sci* 68:991-996
- Silva Elipse MV, Bednarek MA, Gao Y-D (2001) ¹H NMR structural analysis of human ghrelin and its six truncated analogs. *Biopolymers* 59:489-501
- Silverstein RL, Febbraio M (2007) CD36-TSP-HRGP Interactions in the Regulation of Angiogenesis. *Curr Pharm Des* 13:3559-3567
- Sipes JM, Krutzsch HC, Lawler J, Roberts DD (1999) Cooperation between Thrombospondin-1 Type 1 Repeat Peptides and alpha vbeta 3 Integrin Ligands to Promote Melanoma Cell Spreading and Focal Adhesion Kinase Phosphorylation. *J Biol Chem* 274:22755-22762
- Skoglund G, Basmaciogullari A, Rouot B, Marie JC, Rosselin G (1999) Cell-specific localization of G protein alpha-subunits in the islets of Langerhans. *J Endocrinol* 162:31-37
- Smith RG, Van der Ploeg LHT, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ, Wyvratt MJ, Jr., Fisher MH, Nargund RP, Patchett AA (1997) Peptidomimetic Regulation of Growth Hormone Secretion. *Endocr Rev* 18:621-645
- Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai M-J, O'Malley BW (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389:194-198
- Stewart BW, Nagarajan S (2006) Recombinant CD36 inhibits oxLDL-induced ICAM-1-dependent monocyte adhesion. *Mol Immunol* 43:255-267
- Stienstra R, Duval C, Keshtkar S, van der Laak J, Kersten S, Muller M (2008) Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Activation Promotes Infiltration of Alternatively Activated Macrophages into Adipose Tissue. *J. Biol. Chem.* 283:22620-22627
- Stuart LM, Bell SA, Stewart CR, Silver JM, Richard J, Goss JL, Tseng AA, Zhang A, Khoury JBE, Moore KJ (2007) CD36 Signals to the Actin Cytoskeleton and Regulates Microglial Migration via a p130Cas Complex. *J Biol Chem* 282:27392-27401
- Sun B, Boyanovsky BB, Connelly MA, Shridas P, van der Westhuyzen DR, Webb NR (2007) Distinct mechanisms for OxLDL uptake and cellular trafficking by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI. *J Lipid Res* 48:2560-2570
- Sun L, Nicholson AC, Hajjar DP, Gotto AM, Jr., Han J (2003a) Adipogenic differentiating agents regulate expression of fatty acid binding protein and CD36 in the J744 macrophage cell line. *J Lipid Res* 44:1877-1886
- Sun Y, Ahmed S, Smith RG (2003b) Deletion of Ghrelin Impairs neither Growth nor Appetite. *Mol Cell Biol* 23:7973-7981
- Sun Y, Asnicar M, Saha PK, Chan L, Smith RG (2006) Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab* 3:379-386
- Sun Y, Butte NF, Garcia JM, Smith RG (2008) Characterization of Adult Ghrelin and Ghrelin Receptor Knockout Mice under Positive and Negative Energy Balance. *Endocrinology* 149:843-850

- Sunden-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Treutiger CJ (2006) The role of high mobility group box-1 protein in severe sepsis [Pathogenesis and immune response]. *Curr Opin Infect Dis* 19:231-236
- Sundvold H, Lien Sr (2001) Identification of a Novel Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) [gamma] Promoter in Man and Transactivation by the Nuclear Receptor ROR[alpha]1. *Biochem Biophys Res Commun* 287:383-390
- Swerlick RA, Lee KH, Wick TM, Lawley TJ (1992) Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J Immunol* 148:78-83
- Szanto A, Benko S, Szatmari I, Balint BL, Furtos I, Ruhl R, Molnar S, Csiba L, Garuti R, Calandra S, Larsson H, Diczfalusy U, Nagy L (2004) Transcriptional Regulation of Human CYP27 Integrates Retinoid, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, and Liver X Receptor Signaling in Macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 24:8154-8166
- Szanto A, Nagy L (2008) The many faces of PPAR γ : Anti-inflammatory by any means? *Immunobiology* 213:789-803
- Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Delporte C, Coulie B, Meulemans A, Janssens J, Peeters T (2006) Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in humans. *Gut* 55:327-333
- Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Verbeke K, Janssens J, Peeters T (2005) Influence of ghrelin on gastric emptying and meal-related symptoms in idiopathic gastroparesis. *Aliment Pharmacol Ther* 22:847-853
- Tailleux A, Duriez P, Fruchart J-C, Clavey V (2002) Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 164:1-13
- Takahashi Y, Ohoka N, Hayashi H, Sato R (2008) TRB3 suppresses adipocyte differentiation by negatively regulating PPAR γ transcriptional activity. *J Lipid Res* 49:880-892
- Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2000) Ghrelin Strongly Stimulates Growth Hormone Release in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4908-4911
- Taketa K, Matsumura T, Yano M, Ishii N, Senokuchi T, Motoshima H, Murata Y, Kim-Mitsuyama S, Kawada T, Itabe H, Takeya M, Nishikawa T, Tsuruzoe K, Araki E (2008) Oxidized Low Density Lipoprotein Activates Peroxisome Proliferator-activated Receptor- α (PPAR α) and PPAR γ through MAPK-dependent COX-2 Expression in Macrophages. *J. Biol. Chem.* 283:9852-9862
- Tan NS, Michalik L, Desvergne B, Wahli W (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor- β as a target for wound healing drugs. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 8:39-48
- Tanaka M, Hayashida Y, Nakao N, Nakai N, Nakashima K (2001) Testis-specific and developmentally induced expression of a ghrelin gene-derived transcript that encodes a novel polypeptide in the mouse. *Biochim Biophys Acta* 1522:62-65
- Tandon N, Kralisz U, Jamieson G (1989) Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem* 264:7576-7583

- Tang S-Q, Jiang Q-Y, Zhang Y-L, Zhu X-T, Shu G, Gao P, Feng D-Y, Wang X-Q, Dong X-Y (2008) Obestatin: Its physicochemical characteristics and physiological functions. *Peptides* 29:639-645
- Tang-Christensen M, Vrang N, Ortmann S, Bidlingmaier M, Horvath TL, Tschop M (2004) Central Administration of Ghrelin and Agouti-Related Protein (83-132) Increases Food Intake and Decreases Spontaneous Locomotor Activity in Rats. *Endocrinology* 145:4645-4652
- Tannenbaum GS, Epelbaum J, Bowers CY (2003) Interrelationship between the Novel Peptide Ghrelin and Somatostatin/Growth Hormone-Releasing Hormone in Regulation of Pulsatile Growth Hormone Secretion. *Endocrinology* 144:967-974
- Tao N, Wagner SJ, Lublin DM (1996) CD36 Is Palmitoylated on Both N- and C-terminal Cytoplasmic Tails. *J Biol Chem* 271:22315-22320
- Tassone F, Broglio F, Destefanis S, Rovere S, Benso A, Gottero C, Prodam F, Rossetto R, Gauna C, van der Lely AJ, Ghigo E, Maccario M (2003) Neuroendocrine and Metabolic Effects of Acute Ghrelin Administration in Human Obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5478-5483
- Tawadros N, Salamonsen LA, Dimitriadis E, Chen C (2007) Facilitation of decidualization by locally produced ghrelin in the human endometrium. *Mol Hum Reprod* 13:483-489
- Tebbe JJ, Mronga S, Tebbe CG, Ortmann E, Arnold R, Schäfer MKH (2005) Ghrelin-Induced Stimulation of Colonic Propulsion is Dependent on Hypothalamic Neuropeptide Y1- and Corticotrophin-Releasing Factor 1 Receptor Activation. *J Neuroendocrinol* 17:570-576
- Tena-Sempere M (2005) Exploring the role of ghrelin as novel regulator of gonadal function. *Growth Horm IGF Res* 15:83-88
- Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, Gaytan F, Zhang FP, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E (2002) Novel Expression and Functional Role of Ghrelin in Rat Testis. *Endocrinology* 143:717-725
- Tesauro M, Schinzari F, Iantorno M, Rizza S, Melina D, Lauro D, Cardillo C (2005) Ghrelin Improves Endothelial Function in Patients With Metabolic Syndrome. *Circulation* 112:2986-2992
- Thompson NM, Gill DAS, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson ICAF, Wells T (2004) Ghrelin and Des-Octanoyl Ghrelin Promote Adipogenesis Directly in Vivo by a Mechanism Independent of the Type 1a Growth Hormone Secretagogue Receptor. *Endocrinology* 145:234-242
- Togashi M, Borngraeber S, Sandler B, Fletterick RJ, Webb P, Baxter JD (2005) Conformational adaptation of nuclear receptor ligand binding domains to agonists: Potential for novel approaches to ligand design. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93:127-137
- 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

- Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM (1995) PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15:351-357
- Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM (1994a) mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes & Dev.* 8:1224-1234
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM (1994b) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79:1147-1156
- Tontonoz P, Nagy L (1999) Regulation of macrophage gene expression by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma: implications for cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 10:485-490
- Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JGA, Thomazy VA, Evans RM (1998) PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93:241-252
- Torra IP, Ismaili N, Feig JE, Xu C-F, Cavasotto C, Pancratov R, Rogatsky I, Neubert TA, Fisher EA, Garabedian MJ (2008) Phosphorylation of liver X receptor α selectively regulates target gene expression in macrophages. *Mol Cell Biol* 28:2626-2636
- Traebert M, Riediger T, Whitebread S, Scharrer E, Schmid HA (2002) Ghrelin Acts on Leptin-Responsive Neurons in the Rat Arcuate Nucleus. *Journal of Neuroendocrinology* 14:580-586
- Treuter E, Albrechtsen T, Johansson L, Leers J, Gustafsson J-A (1998) A Regulatory Role for RIP140 in Nuclear Receptor Activation. *Mol Endocrinol* 12:864-881
- Triantafyllou M, Gampe FGJ, Leppe PM, Mouratis MA, Schumann C, Harokopakis E, Schifferle RE, Hajishengallis G, Triantafyllou K (2007) Lipopolysaccharides from atherosclerosis-associated bacteria antagonize TLR4, induce formation of TLR2/1/CD36 complexes in lipid rafts and trigger TLR2-induced inflammatory responses in human vascular endothelial cells. *Cellular Microbiology* 9:2030-2039
- Tsao W-C, Wu H-M, Chi K-H, Chang Y-H, Lin W-W (2005) Proteasome inhibitors induce peroxisome proliferator-activated receptor transactivation through RXR accumulation and a protein kinase C-dependent pathway. *Exp Cell Res* 304:234-243
- Tsay Y-G, Wang Y-H, Chiu C-M, Shen B-J, Lee S-C (2000) A Strategy for Identification and Quantitation of Phosphopeptides by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* 287:55-64
- Tschop M, Smiley DL, Heiman ML (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-913
- Tsuchida A, Yamauchi T, Kadowaki T (2005) Nuclear Receptors as Targets for Drug Development: Molecular Mechanisms for Regulation of Obesity and Insulin Resistance by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ , CREB-Binding Protein, and Adiponectin. *J Pharmacol Sci* 97:164-170
- Tudor C, Feige JN, Pingali H, Lohray VB, Wahli W, Desvergne B, Engelborghs Y, Gelman L (2007) Association with coregulators is the major determinant governing peroxisome proliferator-activated receptor mobility in living cells. *J Biol Chem* 282:4417-4426

- Uppenberg J, Svensson C, Jaki M, Bertilsson G, Jendeberg L, Berkenstam A (1998) Crystal Structure of the Ligand Binding Domain of the Human Nuclear Receptor PPAR γ . *J Biol Chem* 273:31108-31112
- van Beekum O, Brenkman AB, Grontved L, Hamers N, van den Broek NJF, Berger R, Mandrup S, Kalkhoven E (2008) The Adipogenic Acetyltransferase Tip60 Targets Activation Function 1 of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ . *Endocrinology* 149:1840-1849
- Van Gaal L, Scheen AJ (2002) Are all glitazones the same? *Diabetes Metab Res Rev* 18:S1-S4
- Vannieuwenhoven FA, Verstijnen CPHJ, Abumrad NA, Willemsen PHM, Vaneyns GJJM, Vandervusse GJ, Glatz JFC (1995) Putative Membrane Fatty Acid Translocase and Cytoplasmic Fatty-Acid-Binding Protein Are Co-expressed in Rat Heart and Skeletal Muscles. *Biochem Biophys Res Commun* 207:747-752
- Vidal-Puig A, Jimenez-Liñan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS, Moller DE (1996) Regulation of PPAR γ gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 97:2553-2561
- Volante M, Allia E, Fulcheri E, Cassoni P, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M (2003) Ghrelin in Fetal Thyroid and Follicular Tumors and Cell Lines: Expression and Effects on Tumor Growth. *Am J Pathol* 162:645-654
- Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E, Papotti M (2002) Expression of Ghrelin and of the GH Secretagogue Receptor by Pancreatic Islet Cells and Related Endocrine Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1300-1308
- Vosper H, Patel L, Graham TL, Khoudoli GA, Hill A, Macphee CH, Pinto I, Smith SA, Suckling KE, Wolf CR, Palmer CNA (2001) The Peroxisome Proliferator-activated Receptor delta Promotes Lipid Accumulation in Human Macrophages. *J Biol Chem* 276:44258-44265
- Wang D-H, Hu Y-S, Du J-J, Hu Y-Y, Zhong W-D, Qin W-J (2009) Ghrelin stimulates proliferation of human osteoblastic TE85 cells via NO/cGMP signaling pathway. *Endocrine* 35:112-117
- Wang L, Yang X, Zhang X, Huang J, Hou J, Li J, Xiong H, Mihalic K, Zhu H, Xiao W, Farrar W (2004a) Transcriptional inactivation of STAT3 by PPAR γ suppresses IL-6-responsive multiple myeloma cells. *Immunity* 20:205-218
- Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, Peng F, Tall AR (2006) LXR-Induced Redistribution of ABCG1 to Plasma Membrane in Macrophages Enhances Cholesterol Mass Efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1310-1316
- Wang Y-X, Zhang C-L, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H, Evans RM (2004b) Regulation of Muscle Fiber Type and Running Endurance by PPAR δ . *PLoS Biol* 2:e294
- Way JM, Harrington WW, Brown KK (2001) Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology* 142:1269-1277

- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808
- Wellen KE, Hotamisligi GS (2003) Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1785-1788
- Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbak C, Vidal-Puig AJ, Flier JS (1997) Ligand-independent Activation Domain in the N Terminus of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ). Differential activity of PPAR γ 1 and -2 isoforms and influence of insulin *J Biol Chem* 272:20230-20235
- Wierup N, Sundler F (2005) Ultrastructure of islet ghrelin cells in the human fetus. *Cell Tissue Res* 319:423-428
- Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F (2002) The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 107:63-69
- Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 9:1033-1045
- Wilmsen HM, Ciaraldi TP, Carter L, Reehman N, Mudaliar SR, Henry RR (2003) Thiazolidinediones upregulate impaired fatty acid uptake in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E354-362
- Wintergerst ES, Jelk J, Rahner C, Asmis R (2000) Apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein in human monocyte-derived macrophages involves CD36 and activation of caspase-3. *Eur J Biochem* 267:6050-6059
- Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R, Moncrieffe M, Thabet K, Cox HJ, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW (2004) Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8227-8232
- Wortley KE, Rincon J-Pd, Murray JD, Garcia K, Iida K, Thorner MO, Sleeman MW (2005) Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *J Clin Invest* 115:3573-3578
- Wu R, Dong W, Zhou M, Zhang F, Marini CP, Ravikumar TS, Wang P (2007) Ghrelin Attenuates Sepsis-induced Acute Lung Injury and Mortality in Rats. *Am J Respir Crit Care Med* 176:805-813
- Wu R, Zhou M, Cui X, Simms HH, Wang P (2004) Upregulation of cardiovascular ghrelin receptor occurs in the hyperdynamic phase of sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H1296-1302
- Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM (1999) Cross-Regulation of C/EBP α and PPAR γ Controls the Transcriptional Pathway of Adipogenesis and Insulin Sensitivity. *J Biol Chem* 274:151-158
- Wuttge DM, Romert A, Eriksson U, T \ddot{u} rmann H, Hansson GK, Sirsj \hat{a} n A (2001) Induction of CD36 by all-trans retinoic acid: retinoic acid receptor signaling in the pathogenesis of atherosclerosis. *FASEB J*. 15:1221-1223
- Wynne K, Giannitopoulou K, Small CJ, Patterson M, Frost G, Ghatei MA, Brown EA, Bloom SR, Choi P (2005) Subcutaneous Ghrelin Enhances Acute Food Intake in

- Malnourished Patients Who Receive Maintenance Peritoneal Dialysis: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *J Am Soc Nephrol* 16:2111-2118
- Xu X, Sook Jhun B, Hoon Ha C, Jin Z-G (2008) Molecular Mechanisms of Ghrelin-Mediated Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation. *Endocrinology* 149:4183-4192
- Yakabi K, Ro S, Onouhi T, Tanaka T, Ohno S, Miura S, Johno Y, Takayama K (2006) Histamine Mediates the Stimulatory Action of Ghrelin on Acid Secretion in Rat Stomach. *Dig Dis Sci* 51:1313-1321
- Yamamoto N, Ikeda H, Tandon NN, Herman J, Tomiyama Y, Mitani T, Sekiguchi S, Lipsky R, Kralisz U, Jamieson GA (1990) A platelet membrane glycoprotein (GP) deficiency in healthy blood donors: Naka- platelets lack detectable GPIV (CD36). *Blood* 76:1698-1703
- Yamashita D, Yamaguchi T, Shimizu M, Nakata N, Hirose F, Osumi T (2004) The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor γ is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain. *Genes Cells* 9:1017-1029
- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL (2008) Identification of the Acyltransferase that Octanoylates Ghrelin, an Appetite-Stimulating Peptide Hormone. *Cell* 132:387-396
- Yang M, Hu S, Wu B, Miao Y, Pan H, Zhu S (2007a) Ghrelin inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity via upregulating heat-shock protein 70. *Biochem Biophys Res Commun* 359:373-378
- Yang Y, Chen M, Loux TJ, Harmon CM (2007b) Regulation of FAT/CD36 mRNA gene expression by long chain fatty acids in the differentiated 3T3-L1 cells *Pediatr Surg Int* 23:675-683
- Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, Motoshima H, Taguchi T, Sonoda K, Kukidome D, Takuwa Y, Kawada T, Brownlee M, Nishikawa T, Araki E (2007) Statins Activate Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Through Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Cyclooxygenase-2 Expression in Macrophages. *Circ Res* 100:1442-1451
- Yano Y, Toshinai K, Inokuchi T, Kangawa K, Shimada K, Kario K, Nakazato M (2009) Plasma des-acyl ghrelin, but not plasma HMW adiponectin, is a useful cardiometabolic marker for predicting atherosclerosis in elderly hypertensive patients. *Atherosclerosis* 204:590-594
- Yasuda T, Masaki T, Kakuma T, Yoshimatsu H (2003) Centrally administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats. *Neurosci Lett* 349:75-78
- Ye Y, Nishi SP, Manickavasagam S, Lin Y, Huang M-H, Perez-Polo JR, Uretsky BF, Birnbaum Y (2007) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) by atorvastatin is mediated by 15-deoxy-delta-12,14-PGJ2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 84:43-53

- Yeh AH, Jeffery PL, Duncan RP, Herington AC, Chopin LK (2005) Ghrelin and a Novel Preproghrelin Isoform Are Highly Expressed in Prostate Cancer and Ghrelin Activates Mitogen-Activated Protein Kinase in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 11:8295-8303
- Yeh S, Chang C (1996) Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5517-5521
- Yesner LM, Huh HY, Pearce SF, Silverstein RL (1996) Regulation of Monocyte CD36 and Thrombospondin-1 Expression by Soluble Mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1019-1025
- Yokote R, Sato M, Matsubara S, Ohye H, Niimi M, Murao K, Takahara J (1998) Molecular Cloning and Gene Expression of Growth Hormone-Releasing Peptide Receptor in Rat Tissues. *Peptides* 19:15-20
- Yoshiga D, Sato N, Torisu T, Mori H, Yoshida R, Nakamura S, Takaesu G, Kobayashi T, Yoshimura A (2007) Adaptor Protein SH2-B Linking Receptor-Tyrosine Kinase and Akt Promotes Adipocyte Differentiation by Regulating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Messenger Ribonucleic Acid Levels. *Mol Endocrinol* 21:1120-1131
- Yu C, Markan K, Temple KA, Deplewski D, Brady MJ, Cohen RN (2005) The Nuclear Receptor Corepressors NCoR and SMRT Decrease Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Transcriptional Activity and Repress 3T3-L1 Adipogenesis. *J Biol Chem* 280:13600-13605
- Yu C, York B, Wang S, Feng Q, Xu J, O'Malley BW (2007) An Essential Function of the SRC-3 Coactivator in Suppression of Cytokine mRNA Translation and Inflammatory Response. *Mol Cell* 25:765-778
- Yu S, Reddy JK (2007) Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta* 1771:936-951
- Yu W, Chen Z, Zhang J, Zhang L, Ke H, Huang L, Peng Y, Zhang X, Li S, Lahn B, Xiang A (2008) Critical role of phosphoinositide 3-kinase cascade in adipogenesis of human mesenchymal stem cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 310:11-18
- Yun MR, Im DS, Lee SJ, Park HM, Bae SS, Lee WS, Kim CD (2009) 4-Hydroxynonenal enhances CD36 expression on murine macrophages via p38 MAPK-mediated activation of 5-lipoxygenase. *Free Radical Biology and Medicine* 46:692-698
- Zeng Y, Tao N, Chung K-N, Heuser JE, Lublin DM (2003) Endocytosis of Oxidized Low Density Lipoprotein through Scavenger Receptor CD36 Utilizes a Lipid Raft Pathway That Does Not Require Caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 278:45931-45936
- Zhang F, Lavan BE, Gregoire FM (2006) Selective Modulators of PPAR- γ Activity: Molecular Aspects Related to Obesity and Side-Effects. *PPAR Res* 2007:32696
- Zhang J, Ferguson SSG, Barak LS, Menard L, Caron MG (1996) Dynamin and beta - Arrestin Reveal Distinct Mechanisms for G Protein-coupled Receptor Internalization. *J Biol Chem* 271:18302-18305

- Zhang M, Yuan F, Liu H, Chen H, Qiu X, Fang W (2008) Inhibition of proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells by ghrelin. *Acta Biochim Biophys Sinica* 40:769-776
- Zhao M, Liu Y, Wang X, New L, Han J, Brunk UT (2002) Activation of the p38 MAP kinase pathway is required for foam cell formation from macrophages exposed to oxidized LDL. *Apmis* 110:458-468
- Zhu Y, Kan L, Qi C, Kanwar YS, Yeldandi AV (2000) Isolation and characterization of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) interacting protein (PRIP) as a coactivator for PPAR. *J Biol Chem* 275:13510
- Zhu Y QC, Calandra C, Rao MS, Reddy JK. (1996) Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Gene Expr* 6:11
- Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK (1997) Isolation and Characterization of PBP, a Protein That Interacts with Peroxisome Proliferator-activated Receptor. *J Biol Chem* 272:25500-25506
- Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor γ (mPPAR γ) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7921-7925
- Zigman J, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus J, Lee C, Jones J, Deysher A, Waxman A, White R, Williams T, Lachey J, Seeley R, Lowell B, Elmquist J (2005) Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115:3564-3572
- Zingg J-M, Ricciarelli R, Andorno E, Azzi A (2002) Novel 5' Exon of Scavenger Receptor CD36 Is Expressed in Cultured Human Vascular Smooth Muscle Cells and Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:412-417

