



HAL
open science

Implication de ghrelina/obestatine, deux peptides issus du même précurseur, dans le contrôle de la sécrétion d'hormone de croissance et du comportement alimentaire.

Philippe Zizzari

► To cite this version:

Philippe Zizzari. Implication de ghrelina/obestatine, deux peptides issus du même précurseur, dans le contrôle de la sécrétion d'hormone de croissance et du comportement alimentaire.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT: . tel-00129504v1

HAL Id: tel-00129504

<https://theses.hal.science/tel-00129504v1>

Submitted on 7 Feb 2007 (v1), last revised 7 Feb 2007 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

Année 2007

N°attribué par la bibliothèque



THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Spécialité : Neuroendocrinologie

présentée et soutenue publiquement le 25 Janvier 2007

par

Philippe Zizzari

Titre

**IMPLICATION DE GHRELIN/OBESTATINE, DEUX PEPTIDES ISSUS DU
MEME PRECURSEUR, DANS LE CONTROLE DE LA SECRETION D'HORMONE
DE CROISSANCE ET DU COMPORTEMENT ALIMENTAIRE**

Directeur de thèse : Mme Marie-Thérèse BLUET-PAJOT

JURY

M. Mohammed TAOUIS	Président
M. Youssef ANOUAR	Rapporteur
M. Jean-Louis NAHON	Rapporteur
Mme Nadine BINART	Examineur
Mme Marie-Thérèse BLUET-PAJOT	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier les membres du jury qui me font l'honneur de bien vouloir juger ce travail :

- Monsieur Mohammed Taouis pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury de thèse.

- Messieurs Youssef Anouar et Jean-Louis Nahon pour avoir bien voulu étudier et juger ce travail. Je leur adresse ici mes remerciements les plus sincères.

- Madame Nadine Binart pour avoir accepté de siéger dans ce jury de thèse.

et je les prie de bien vouloir accepter le témoignage de mon profond respect.

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire ont été réalisés au laboratoire de Neurobiologie de la Croissance et de la Sénescence (INSERM U549) dirigé par Monsieur Jacques Epelbaum. Je lui exprime ici ma profonde gratitude pour m'avoir offert l'opportunité d'effectuer cette thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Marie-Thérèse Bluet-Pajot de m'avoir accueilli dans son équipe, il y a déjà 10 ans maintenant, de m'avoir transmis sa passion de la neuroendocrinologie et des modèles « in vivo ». Merci pour toutes ces années passées ensemble. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance et ma sincère amitié.

Je remercie Virginie Tolle, qui a initié le travail sur la ghreline, et avec laquelle j'espère nous allons le poursuivre jusqu'à ce que mort s'en suive ... Qu'elle trouve ici l'expression de toute mon amitié.

Je souhaite également présenter mes remerciements à Monsieur Claude Kordon qui m'a permis de faire mes premiers pas dans son laboratoire lors de mon DEA et a beaucoup œuvré pour obtenir la création du poste d'ingénieur que j'occupe actuellement.

Ces travaux ont pu avoir lieu grâce aux différentes collaborations menées avec : Christine Foulon et Rolland Dardennes de la clinique des maladies mentales & de l'encéphale (CMME) de Sainte Anne, le service « Endocrinologie-Diabète et Maladies Métaboliques » de l'hôpital Bellevue dirigé par le Professeur Bruno Estour, le Dr Francesco Rubino de l'Institut de Recherche contre les Cancers de l'Appareil Digestif (IRCAD), et Catherine Tomasetto de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC).

Un grand merci au personnel hospitalier et aux patients qui nous ont permis de réaliser les études cliniques qui ont été présentées dans ce manuscrit.

Merci à tous les membres du laboratoire pour leur sympathie, leurs enseignements et leur disponibilité.

Parmi eux, je souhaite remercier plus particulièrement :

Mesdames Marie-Hélène Bassant et Frédérique Poindessous-Jazat pour leur apport à l'étude de l'état Veille/Sommeil.

Monsieur Pierre-Marie Sinet pour son support technique en biologie moléculaire, sa grande patience et sa constante disponibilité face à mes questionnements.

Madame Alice Cougnon pour avoir chouchouté nos petits pensionnaires,

Monsieur Dominique Grouselle pour la mise au point des dosages immuno-enzymatiques ghreline.

Madame « Yvonne » pour sa gentillesse et son aide précieuse.

Mesdames Catherine Rogers et Catherine Videau pour leur patience et leur disponibilité.

Je souhaite enfin exprimer ma reconnaissance affectueuse à ma famille et à mes amis pour m'avoir supporté au sens propre comme au sens figuré tout au long de ces années. Enfin je n'oublierai jamais « le petit coup de pouce » de David sans qui peut être cette thèse n'aurait pas existé.

« Si l'on considérait une théorie comme parfaite et si l'on cessait de la vérifier par l'expérience scientifique, elle deviendrait une doctrine.»

Claude Bernard

A mes parents,

A Fanny,

A mes deux petites louloutes.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	6
ABREVIATIONS	7
AVANT PROPOS	9
INTRODUCTION	10
A) L'HORMONE DE CROISSANCE (GH)	11
I. Structure de l'hormone de croissance	11
II. Récepteur et protéines de liaison de l'hormone de croissance	11
III. Fonctions de l'hormone de croissance	13
III-1. Effets de GH sur la croissance	13
III-2. Rôle de la GH dans la régulation des métabolismes lipidique, protéique, glucidique	13
III-3. Autres effets de la GH	14
IV. Les somatomédines (IGFs)	14
V. Mode de sécrétion de l'hormone de croissance	15
VI. Régulation de la sécrétion d'hormone de croissance	16
VI-1. Somatostatine (SRIH)	17
VI-2. Somatolibérine (GHRH)	19
VI-3. Interactions intrahypothalamiques SRIH-GHRH	20
VI-4. Autres facteurs centraux et périphériques impliqués dans la régulation de la sécrétion de GH	22
VI-4-a. Facteurs centraux.....	22
VI-4-b. Facteurs d'origine périphériques.....	24
VI-5. Modèles mathématiques du contrôle de la sécrétion de GH. (figure 10)	26
B) COMPORTEMENT ALIMENTAIRE	29
I. Systèmes hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire (figure 11)	30
I-1. Localisation anatomique du contrôle de la prise alimentaire	30
I-1-a. Les neurones de premier ordre.....	30

I-1-b. Les neurones de second ordre	30
I-2. Populations neuronales orexigènes	31
I-2-a. Les neurones à NPY	31
I-2-b. Les neurones à AgRP	31
I-2-c. Les neurones à MCH	32
I-2-d. Les neurones à orexine/hypocretine	32
I-3. Populations neuronales anorexigènes	33
I-3-a. Les neurones à POMC : système mélanocortine	33
I-3-b. Les neurones à CART (Cocaïne Amphétamine Regulated Transcript)	33
I-3-c. Les neurones à corticolibérine (CRH)	34
II. Signaux périphériques contrôlant la prise alimentaire	34
II-1. La régulation à court terme	35
II-1-a. Les macronutriments	35
II-1-b. Peptides gastrointestinaux	35
II-2. La régulation à long terme	38
II-2-a. L'insuline	38
II-2-b. La leptine	39
C) LES GH SECRETAGOGUES (GHS)	41
I. Les GHS de synthèse : du GHRP6 au MK-0677 (figure 13)	41
II. Du récepteur des GHS, le GHSR1a, à son ligand endogène la ghreline	41
II-1. Clonage du récepteur GHSR1a	42
II-2. La ghreline	43
II-2-a La ghreline et ses différentes formes (figure 15)	43
II-2-b. Caractérisation des sites de liaison de la ghreline sur le GHSR1a.	44
II-2-c. Autres récepteurs auxquels se lie la ghreline	45
III. Distribution du GHSR1a et de la ghreline	46
III-1. GHSR1a	46
III-2. La ghreline (tableau 1B)	47
IV. Effets biologiques de la ghreline exogène (figure 17)	48
IV-1. Effet sur la libération de GH.	48

IV-2. Effet orexigénique.....	49
IV-3. Effet sur le métabolisme énergétique.....	50
IV-4. Autres effets de la ghreline	50
OBJECTIF DE CE TRAVAIL	53
RESULTATS	54
1 ^{ère} partie.....	55
La ghreline endogène: sa sécrétion et sa relation avec la sécrétion de GH et la prise alimentaire	
Article 1 : Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. <i>Endocrinology</i> . 2002 Apr;143(4):1353-61	
Article 2 : Zizzari P, Halem H, Taylor J, Dong JZ, Datta R, Culler MD, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. Endogenous ghrelin regulates episodic growth hormone (GH) secretion by amplifying GH Pulse amplitude: evidence from antagonism of the GH secretagogue-R1a receptor. <i>Endocrinology</i> . 2005 Sep;146(9):3836-42	
2 ^{ème} Partie	67
Sécrétion de ghreline dans des situations physiologiques ou pathologiques où sécrétion de GH et/ou comportement alimentaire sont modifiés	
Article 3 : Tolle V, Kadem M, Bluet-Pajot MT, Frere D, Foulon C, Bossu C, Dardennes R, Mounier C, Zizzari P, Lang F, Epelbaum J, Estour B. Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. <i>J Clin Endocrinol Metab</i> . 2003 Jan;88(1):109-16	
Article 4 : Rubino F, Zizzari P, Tomasetto C, Bluet-Pajot MT, Forgione A, Vix M, Grouselle D, Marescaux J. The role of the small bowel in the regulation of circulating ghrelin levels and food intake in the obese Zucker rat. <i>Endocrinology</i> . 2005 Apr;146(4):1745-51	
3 ^{ème} partie	74
Ghreline et obestatine	
Article 5 : Zizzari P., Longchamps R., Epelbaum J., Bluet-Pajot M.T. Obestatin partially affect ghrelin stimulation of food intake and GH secretion in rodents. En revision à <i>Endocrinology</i>	
4 ^{ème} partie :	77
Polymorphismes dans le gène ghreline/obestatine et troubles du comportement alimentaire	

Article 6 : Dardennes RM*, Zizzari P*, Tolle V, Foulon C, Kipman A, Romo L, Iancu-Gontard D, Boni C, Sinet PM, Bluet Pajot MT, Estour B, Mouren MC, Guelfi JD, Rouillon F, Gorwood P, Epelbaum J : Family trios analysis of common polymorphisms in the obestatin/ghrelin, BDNF and AGRP genes in patients with Anorexia nervosa : association with subtype, body-mass index, severity and age of onset. A paraître dans Psychoneuroendocrinology

CONCLUSION GENERALE 81

**ARTICLES ET REVUES COMPLEMENTAIRES SUR LES GHS ET LA GHRELIN
..... 132**

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

	Page	
Figure 1 :	Structure de l'hormone de croissance	11
Figure 2 :	Signalisation du récepteur de l'hormone de croissance	12
Figure 3 :	Effets biologiques de l'hormone de croissance	13
Figure 4 :	Effets biologiques de la somatomédine C	15
Figure 5 :	Profils de sécrétion spontanée de GH chez le rat et chez l'homme	16
Figure 6 :	La somatostatine et ces récepteurs	17
Figure 7 :	Mécanismes de transduction des récepteurs de la SRIH et de la GHRH mis en jeu dans la cellule somatotrope	18
Figure 8 :	La GHRH et son récepteur	19
Figure 9 :	Principaux facteurs d'origine hypothalamique, extra-hypothalamique et périphériques impliqués dans la régulation de la sécrétion de GH	24
Figure 10 :	Modèles hypothétiques du contrôle de la sécrétion d'hormone de croissance	26
Figure 11 :	Représentation des neurones et de leurs projections participant au contrôle de la prise alimentaire et de la balance énergétique au niveau de l'hypothalamus	30
Figure 12 :	Modèle d'intégration des signaux d'adiposité et de satiété	40
Figure 13 :	Structure de 3 principaux sécrétagogues de la GH	41
Figure 14 :	Le récepteur GHS R1a et ses voies de signalisation	42
Figure 15 :	Les différentes formes de ghreline chez l'homme et chez le rat	43
Figure 16 :	Interaction de la ghreline avec le GHS R1a	44
Figure 17 :	Effets pléiotropes des la ghreline et des GHS	48
Figure 18 :	Théorie de l'agoniste proté	65
Figure 1R :	Intéraction des inhibiteurs de protéase avec le dosage EIA de la ghreline octanoylée	58
Figure 2R :	Détermination de la $\frac{1}{2}$ vie de la ghreline exogène dans le plasma de rat	58
Figure 3R :	Sécrétion spontanée de ghreline	59
Figure 4R :	Sécrétion spontanée de ghreline totale et de ghreline octanoylée	60
Figure 5R :	Sécrétion spontanée de GH, ghreline totale et de ghreline octanoylée	61
Figure 6R :	Sécrétion spontanée de ghreline et prise alimentaire	62
Figure 7R :	Variation des taux de ghreline plsmatique en fonction du statut en GH	68
Figure 8R :	Variation des taux d'obestatine en fonction du statut nutritionnel	76
Tableau 1A :	Principaux sites de distribution du GHSR 1a	46
Tableau 1B :	Principaux sites de distribution de la ghreline	47
Tableau 2 :	Facteurs impliqués à la fois dans le contrôle de la prise alimentaire et dans le contrôle de la sécrétion de GH	52

ABBREVIATIONS

a.a : acide aminé
AC : adénylate cyclase
Ach : acétylcholine
ACTH : hormone corticotrope
AgRP : peptide apparenté à la protéine Agouti
AN : anorexie nerveuse
AHL : aire hypothalamique latérale
 α MSH : hormone mélanotrope (Melanocyte Stimulating Hormone)
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ARC : noyau arqué hypothalamique
ARNm : acide ribonucléique messenger
ATP : adénosine triphosphate
AVP : vasopressine
BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau (Brain Derived Neurotrophic Factor)
CART : transcrit régulé par la cocaïne et l'amphétamine (Cocaine Amphetamine Regulated Transcript)
CCK : cholecystokinine
CREB : protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (cAMP-response element binding protein)
5 HT : 5-hydroxytryptophane ou sérotonine
CLIP : peptide de la famille des corticotropes du lobe intermédiaire
CRH : corticolibérine
CRH-R : récepteur de la corticolibérine
DA : dopamine
DAG : diacylglycérol
DMH : noyau dorso médian hypothalamique
EDTA : éthylène di amine tetra acétique
EIA : dosage immunoenzymatique
EM : éminence médiane
GAL : galanine
GH : hormone de croissance (Growth Hormone)
GHBP : protéine de liaison de l'hormone de croissance
GH-R : récepteur de l'hormone de croissance
GHRH : somatolibérine (Growth Hormone Releasing Hormone)
GHS : sécrétagogue de l'hormone de croissance
GHS-R1a : récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance de type 1a
GLP1 : peptide de la famille du glucagon 1
ICV : intracérébroventriculaire
IGF : somatomédine (Insulin Growth Factor)
IGFBP : protéine de liaison des somatomédines
IL : interleukine
IMC : indice de masse corporelle
IP3 : inositol triphosphate
IRS : substrat du récepteur de l'insuline
IV : intraveineux
JAK : Janus kinase
kDa : kilo dalton
KO : délété pour (Knock out)

MAP-K : protéines kinases activée par les mitogènes (Mitogen Activated Protein Kinase)
MCH : hormone de concentration de la mélanine (Melanin Concentrating Hormone)
MC-R : récepteur des mélanocortines
MC3R : récepteur de type 3 des mélanocortines
MC4R : récepteur de type 4 des mélanocortines
MTLRP : peptide en relation avec la motiline (Motilin Related Peptide)
NA : noradrénaline
NPV : noyau paraventriculaire hypothalamique
NPY : neuropeptide Y
NPY Y1 à 6 : sous types 1 à 5 du récepteur du neuropeptide Y
NTS : noyau du tractus solitaire
OX 1 et 2 : récepteurs de l'orexine
OXM : oxyntomoduline
PACAP : peptide activateur de l'adénylate cyclase pituitaire
PeV : noyau périvericulaire hypothalamique
PHMB : acide p-hydroxy-mercuribenzoic
PI3K : Kinase-3 phosphoinositides (Phosphoinositides 3-Kinase)
Pit 1 : facteur de transcription du domaine POU
PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PL : hormone lactogène placentaire
pM : pico molaire
POMC : proopiomélanocortine
PRL : prolactine
PYY : peptide YY
RIA : dosage radioimmunologique
SC : sous cutané
SHP-2 : tyrosine phosphatase contenant le domaine src2
SNC : système nerveux central
SOCS : suppresseurs de signalisation des cytokines
SP : substance P
SRIH : somatostatine (Somatotrope Release Inhibiting Hormone)
Sst1 à sst5 : sous types 1 à 5 du récepteur de la somatostatine
STATS : signaux activateurs de transcription
TRH : thyroolibérine
T3 : triiodothyronine
VIP : peptide intestinal vasoactif
VMH : noyau ventromédian hypothalamique

AVANT PROPOS

La régulation de la taille et le maintien de l'homéostasie énergétique sont deux des éléments essentiels à la survie des animaux.

- La taille peut être corrélée avec des paramètres vitaux très divers : la plupart des espèces de grande taille vivent plus longtemps, s'adaptent mieux aux variations de l'environnement et investissent beaucoup d'énergie dans la qualité de leur reproduction.
- L'homéostasie énergétique, processus par lequel les réserves de l'organisme stockées sous forme de tissu adipeux sont maintenues à l'équilibre au cours du temps, nécessite que les dépenses énergétiques soient équivalentes aux apports caloriques. Chez les mammifères une rupture de cet équilibre peut aboutir à l'obésité ou à la dénutrition.

Ces 2 éléments sont sous la dépendance de mécanismes excessivement complexes qui ont à réguler, entre autres, la sécrétion de l'hormone de croissance et le comportement alimentaire. De plus ces 2 fonctions d'une part interagissent entre elles (la sécrétion de GH est modifiée dans les troubles du comportement alimentaire, augmentée chez l'anorexique, diminuée chez l'obèse ; le comportement alimentaire est modifié chez les patients déficients en GH), d'autre part sont régulées par des facteurs communs mais pouvant soit inter-agir, soit agir indépendamment (à titre d'exemple le NPY diminue la sécrétion de GH mais augmente le comportement alimentaire).

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'un de ces facteurs : la ghreline.

Dans l'introduction nous présentons un bref rappel d'une part des mécanismes impliqués dans la régulation de la sécrétion de GH et du comportement alimentaire et d'autre part de la découverte de la ghreline et de ses effets qui nous ont amenés à nous intéresser au rôle du peptide endogène.

INTRODUCTION

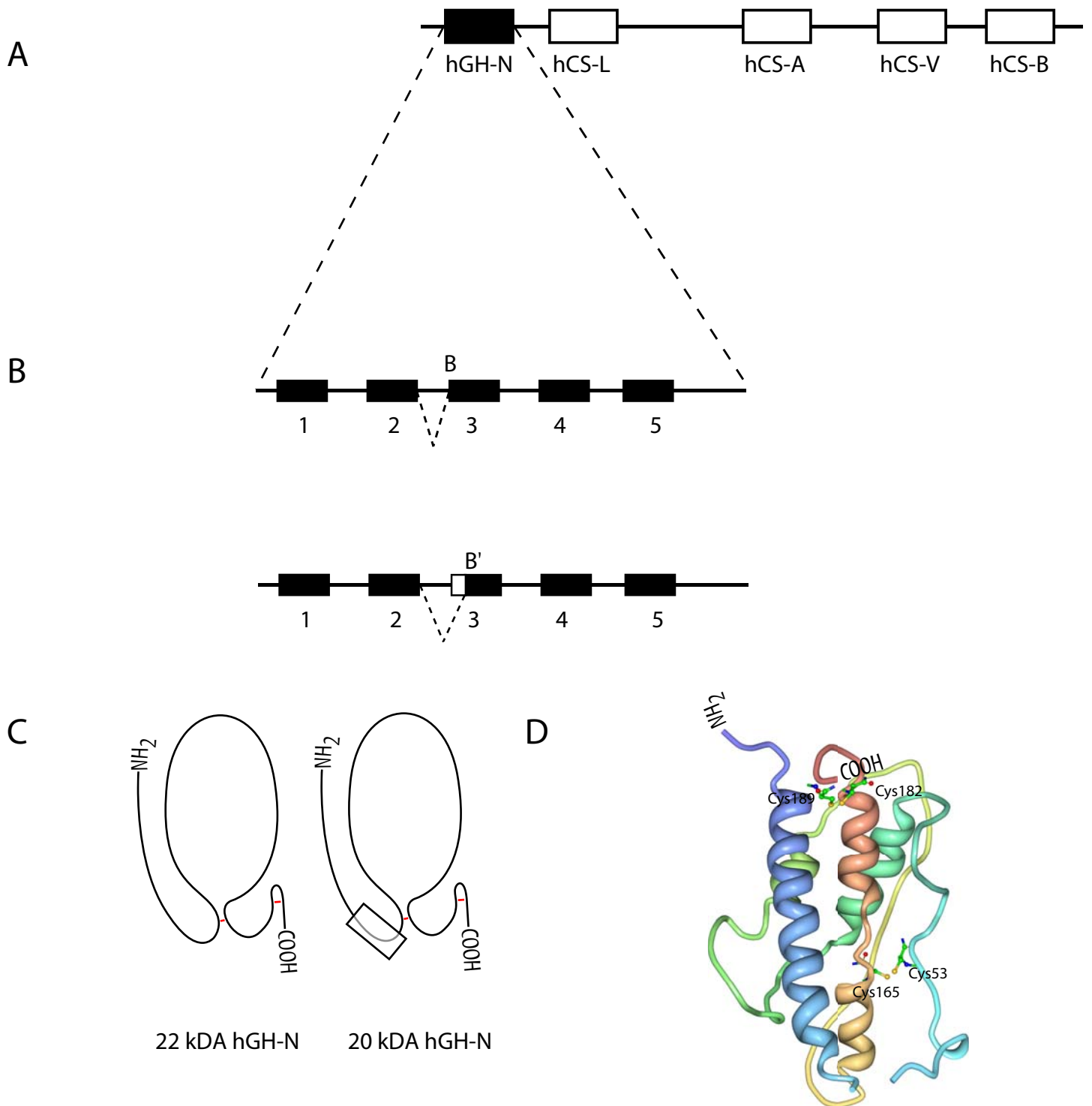


Figure 1 :

A- Les 5 gènes du cluster de l'hormone de croissance humaine. Chaque rectangle représente un gène unique. Le gène hGH-N est exprimé au niveau de l'hypophyse alors que les 4 autres gènes sont exprimés au niveau du placenta.

B- Epissage des exons 2 et 3. (B) et (B') représentent les sites accepteurs d'épissage. Le rectangle blanc représente la région qui est exclue lors de l'épissage alternatif du transcript hGH-N et qui génère la forme de 20 kDa.

C- Représentation schématique des formes majoritaires de GH. Les ponts disulfures sont représentés en rouge. Le rectangle indique la région où les 15 acides aminés sont déléétés dans la forme de 20 kDa

D- Représentation tridimensionnelle de la forme de 22 kDa de l'hormone de croissance

A) L'HORMONE DE CROISSANCE (GH)

I. Structure de l'hormone de croissance

Recherchée dès 1920 suite aux travaux d'Evans et Long qui avaient montré que l'injection d'extraits hypophysaires induisait le gigantisme chez le rat (Evans et Long, 1921) l'hormone de croissance (Growth Hormone : GH) n'a été isolée et purifiée qu'en 1944 à partir d'hypophyses bovines (Li et Evans, 1944). C'est une hormone polypeptidique de la même famille que la prolactine (PRL) et l'hormone lactogène placentaire (PL). Les gènes de GH et de PRL proviendraient de la duplication d'un même gène ancestral au début de l'évolution des vertébrés, il y a 350 à 400 millions d'années. Une seconde duplication lors de l'évolution des primates, il y a 85 à 100 millions d'années serait à l'origine de la PL. Chez l'homme, il existe 80% d'homologie entre GH et PL et seulement 16% d'identité au niveau des séquences nucléotidiques de GH et PRL (Niall *et al.*, 1971; Shome et Parlow, 1977).

Le gène de la GH humaine (figure 1) comporte environ 2600 nucléotides, il est situé sur le bras long du chromosome 17. Il comporte 5 exons et 4 introns et donne un transcrit primaire qui génère, après épissage alternatif, 2 isoformes protéiques qui ont un poids moléculaire de 20 et 22 kDa respectivement (DeNoto *et al.*, 1981; Lewis *et al.*, 1980). Dans l'hypophyse la forme de 22 kDa représente 90% aussi bien des ARNm codant pour la GH (Baumann, 1991) que de la protéine elle-même (Zhan *et al.*, 2005). La forme de 20 kDa ne possède pas les acides aminés 32 à 46 (exon 2) (Lewis *et al.*, 1980).

Chez l'homme la forme la plus abondante de GH est composée d'une chaîne de 191 acides aminés (aa) dont la structure tridimensionnelle se présente sous forme de deux spirales concentriques stabilisées par deux ponts disulfures entre les résidus cystine 53-165 et 182-189. Chez le rat, la GH ne compte que 190 aa.

La GH est principalement sécrétée dans la circulation générale par les cellules du lobe antérieur de l'hypophyse. Au niveau de ses cellules cibles elle agit soit directement en activant son propre récepteur GH-R soit indirectement par l'intermédiaire des somatomédines (ou encore insulin growth factor 1, 2: IGF-1, IGF-2) dont elle stimule la synthèse et la libération au niveau du foie.

II. Récepteur et protéines de liaison de l'hormone de croissance

Le récepteur de la GH a été cloné chez l'homme en 1987 (Leung *et al.*, 1987). Il fait

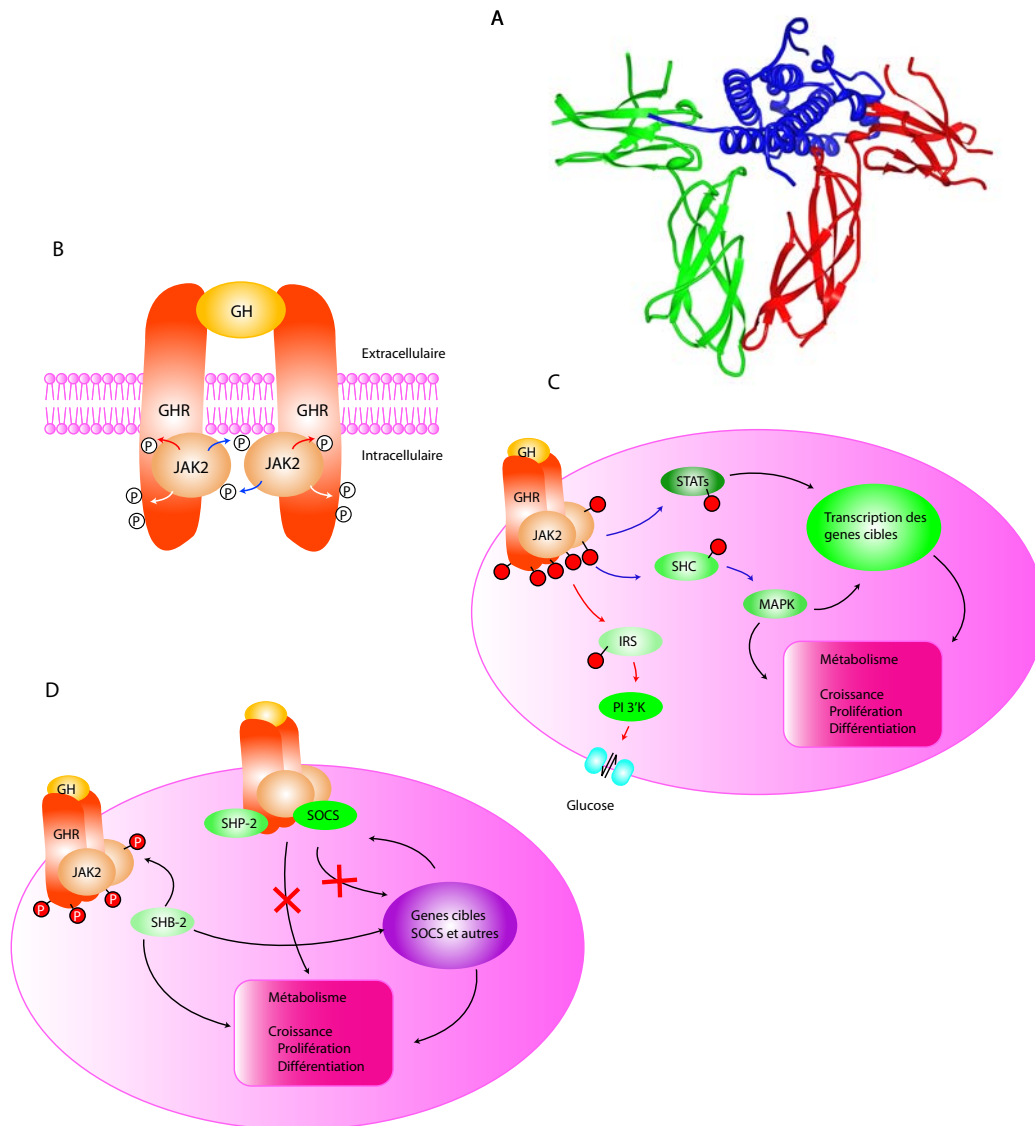


Figure 2 : Signalisation du récepteur de l'hormone de croissance (Adapté de Herrington et al, 2001)

A- Représentation tridimensionnelle de la fixation de l'hormone de croissance (en bleu) à deux récepteurs de l'hormone de croissance (en rouge et vert)
 B- Modèle d'activation de la tyrosine kinase JAK2 par la GH. L'homodimérisation du récepteur s'accompagne d'un changement de conformation de la séquence intracellulaire avec rapprochement des deux molécules de JAK2 qui se phosphorylent mutuellement (flèches bleues). Les molécules de JAK2 ainsi activées peuvent s'auto-phosphoryler (flèches rouges), et phosphoryler les tyrosines du domaine cytoplasmique de l'hormone de croissance (flèches blanches). Ces phospho-tyrosines (JAK2 et récepteur de la GH) forment des sites de fixation pour les protéines de signalisation.
 C- Représentation de certaines voies de signalisation du récepteur de la GH. JAK2 phosphoryle SHC, ce qui entraîne l'activation de la MAPK (flèches bleues). JAK2 phosphoryle également les facteurs de transcription STATs. MAPK et STATs sont importants pour la régulation de la transcription des gènes (flèches noires). JAK2 phosphorylent les protéines IRS, qui vont entraîner l'activation de la PI3'-K (flèches rouges), favorisant ainsi le transport du glucose.
 D- Régulation de la voie de signalisation JAK2. SH2-B augmente la signalisation du récepteur de la GH en augmentant l'activité de JAK2. L'induction de l'expression des protéines SOCS par la GH inhibe la voie de signalisation du récepteur de la GH en diminuant l'activité de JAK2. Les tyrosines phosphatases, comme SHP-2, contribuent à inhiber les voies de signalisation du GHR en de-phosphorylant les sites du récepteur de la GH et/ou ceux de JAK2.

Abbreviations: GH, hormone de croissance; GHR, récepteur de GH; JAK2, Janus kinase 2; P, phosphate; IRS, substrats du récepteur de l'insuline; MAPK, Protéines Kinases Activée par les mitogènes; PI 3'K, Kinase-3 phosphoinositides; STAT, signaux activateurs de transcription; SHP-2, tyrosine phosphatase contenant le domaine src2; SOCS, suppresseurs de signalisation des cytokines.

partie de la famille des récepteurs des cytokines de classe 1 qui se caractérisent par la présence d'un seul domaine transmembranaire et par l'absence de tyrosine kinase intrinsèque. C'est une protéine de 620 acides aminés (a.a) formant un domaine extracellulaire de 246 a.a, un domaine transmembranaire de 24 a.a et un domaine intracellulaire de 350 a.a.

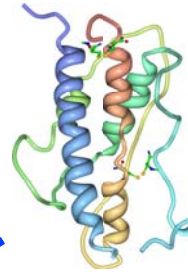
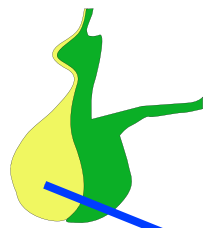
La fixation d'une molécule de GH sur un des sites du domaine extracellulaire d'un premier récepteur suivie de la fixation de la même molécule de GH sur un second site de fixation d'un autre récepteur entraîne une homodimérisation du récepteur (Cunningham *et al.*, 1991) (figure 2 A). Cette homodimérisation s'accompagne d'un changement de conformation de la séquence intracellulaire et augmente l'affinité de cette dernière pour une molécule relais, la Janus kinase (JAK2). La JAK2 subit alors une autophosphorylation (figure 2B) qui entraîne à son tour l'activation d'une classe de transducteurs de signaux activateurs de la transcription (STATS), des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) et de la kinases-3 phosphoinositide (PI3K (figure 2C)). L'activation des STATS entraîne la formation d'inhibiteurs de signalisation, comme les suppresseurs de signalisation des cytokines (SOCS) et la protéine contenant un domaine SH2 inductible par les cytokines (CIS). Ces inhibiteurs exercent en retour une action négative sur les cascades activées par les JAK (Greenhalgh et Alexander, 2004)(figure 2D).

L'accès de la GH circulante à son récepteur est régulée par des protéines présentes dans la circulation générale et capables de lier l'hormone de croissance. Six de ces protéines, appelées protéines de liaison, ont été caractérisées (GHBP 1 à 6), la GHBP2 étant actuellement la plus étudiée. Elle présente une homologie complète avec la séquence C-terminale du GHR. Chez l'homme et le lapin (Baumann *et al.*, 1986; Spencer *et al.*, 1988) la production de GHBP2 est exclusivement due à une protéolyse du domaine extracellulaire du GHR (la protéase responsable étant une métallo-enzyme membranaire), chez le rat et la souris elle est assurée par un épissage alternatif (Baumbach *et al.*, 1989; Edens *et al.*, 1994), et chez le singe rhésus les deux modes de production semblent co-exister (Martini *et al.*, 1997). Le principal site de production des protéines de liaison est le foie mais elles peuvent aussi être produites par d'autres organes et jouer un rôle local dans la liaison de l'hormone à ses cibles.

Ces protéines agissent à plusieurs niveaux pour réguler la quantité de GH disponible au niveau de ses cibles :

- la GHBP2 est capable de former un hétérodimère avec le récepteur proprement dit ce qui empêche l'activation normale du récepteur (Mannor *et al.*, 1991).
- la constante de dissociation relativement élevée du complexe protéine de liaison/hormone permet un lent relargage de l'hormone et donc ralentit sa clairance métabolique par le rein.

Hypophyse



Hormone de croissance

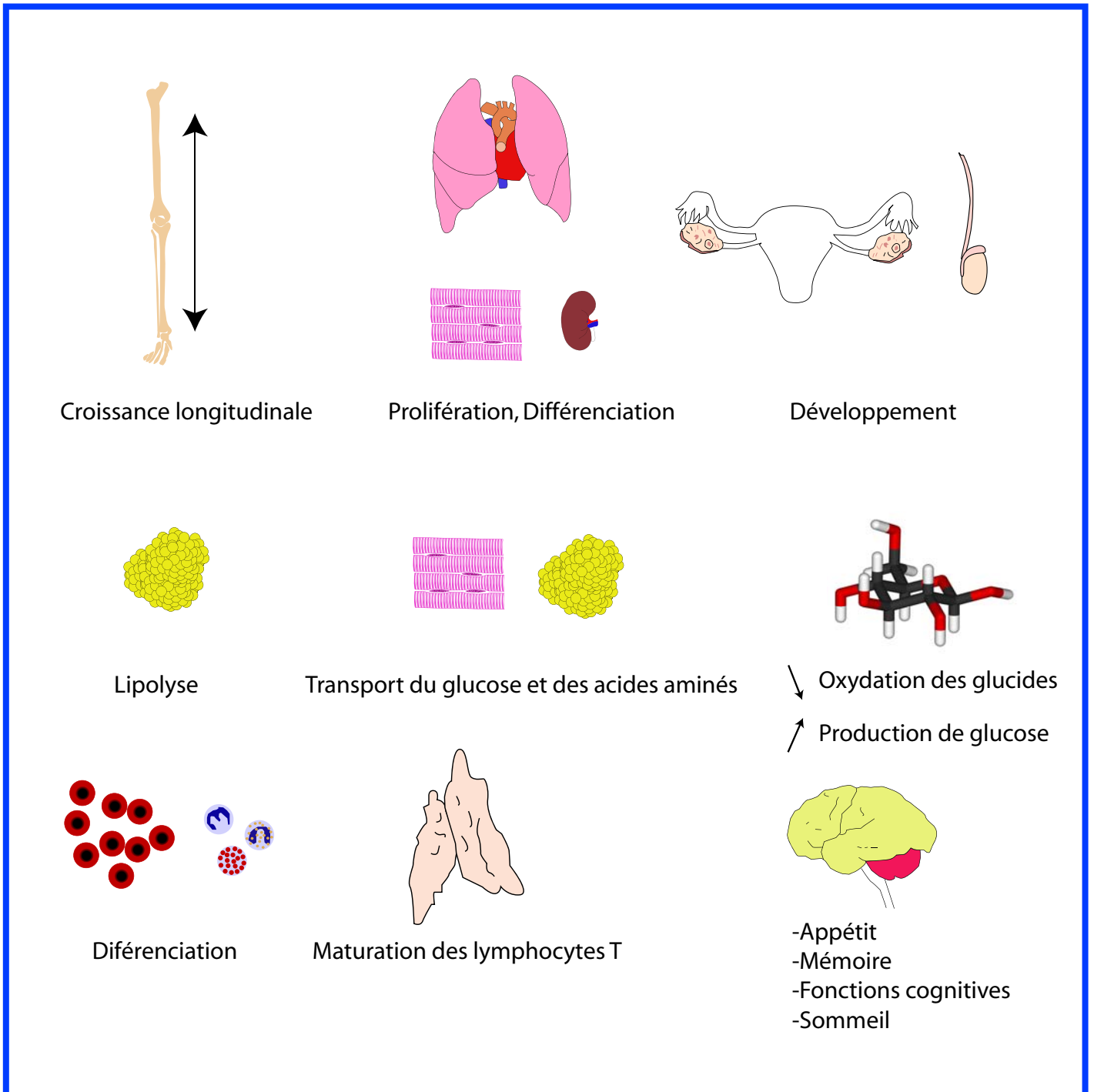
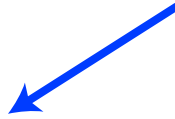


Figure 3 : Effets biologiques de l'hormone de croissance

Chez l'animal, la co-injection de GHBP et de GH augmente la demi-vie de la GH (Tzanela *et al.*, 1997)

III. Fonctions de l'hormone de croissance

Les récepteurs de l'hormone de croissance sont très largement distribués dans l'organisme ; on en trouve notamment dans le système nerveux central, le cartilage, les adipocytes, les lymphocytes mais c'est au niveau du foie qu'ils sont le plus fortement exprimés (Lobie *et al.*, 1993; Waters *et al.*, 1990)). Cette expression du GH-R par un grand nombre d'organes correspond à l'extrême diversité des actions de l'hormone de croissance, les principales étant la croissance et la régulation des métabolismes glucidique, lipidique et protéique (figure 3).

III-1. Effets de GH sur la croissance

La croissance des organismes jeunes est l'une des fonctions principales de la GH. En stimulant la différenciation des pré-chondrocytes en chondrocytes et la prolifération des chondrocytes du cartilage de conjugaison, la GH favorise la croissance longitudinale des os (Isaksson *et al.*, 1987).

La GH participe également à la prolifération et à la différenciation de nombreux tissus comme le rein, le cœur, les poumons, les muscles squelettiques. Elle joue aussi un rôle dans la reproduction en favorisant le développement des gonades au moment de la puberté (Spiteri-Grech et Nieschlag, 1992)

III-2. Rôle de la GH dans la régulation des métabolismes lipidique, protéique, glucidique

La GH a une action sur la lipolyse. Chez le sujet déficient en GH la masse grasse est augmentée (De Boer *et al.*, 1992) alors que chez l'acromégale, qui présente des concentrations plasmatiques en GH très élevées, elle est diminuée (Bengtsson *et al.*, 1989). Dans les 2 cas la normalisation des taux de GH s'accompagne d'une normalisation des taux de masse grasse.

La GH semble agir en :

- Diminuant l'activité de la lipoprotéine lipase réduisant ainsi l'influx d'acide gras au niveau de l'adipocyte (Johansen *et al.*, 2003)
- En diminuant la taille des adipocytes et en diminuant la lipogénèse (Kamel *et al.*, 2000).

- En augmentant l'utilisation des graisses et leur oxydation (Brandou *et al.*, 2006).

La GH a des propriétés anabolisantes importantes, elle augmente la rétention azotée. Par ailleurs dans le muscle strié et dans le tissu adipeux la GH augmente la capacité de transport du glucose et des acides aminés.

III-3. Autres effets de la GH

La GH intervient aussi dans le système immunitaire. Elle joue un rôle important dans l'érythropoïèse en stimulant la différenciation des cellules souches en érythrocytes et en granulocytes. Elle agit également sur le thymus, dont elle favorise la croissance et la sécrétion locale de thymuline qui joue un rôle dans la réponse immunitaire en favorisant la maturation des lymphocytes T. L'hypersécrétion d'hormone de croissance observée chez les acromégales, mais également chez des souris transgéniques surexprimant l'hormone, s'accompagne de taux plasmatiques élevés de thymuline. A l'inverse, chez les enfants (et les animaux) atteints de nanisme hypophysaire, les taux de thymuline sont bas. Chez les sujets âgés, qui présentent une sécrétion faible de GH comme de thymuline, l'administration de GH tend à rétablir des taux normaux de thymuline.

La GH est également capable de stimuler la production d'interleukine (Pagani *et al.*, 2005). Chez l'acromégale, l'ablation de l'hypophyse destinée à prévenir les effets de l'hypersécrétion pathologique d'hormone de croissance, entraîne une diminution des taux circulants des interleukines IL-6 et IL-12, ainsi que de l'interféron gamma. A fortes concentrations, la GH pourrait ainsi favoriser l'inflammation en modulant l'équilibre des deux grandes classes de lymphocytes qui produisent les cytokines, Th1 et Th2, et régulent ainsi le développement de réactions inflammatoires. Mais à faibles doses, elle peut également avoir des effets anti-inflammatoires en diminuant la production de radicaux libres par les macrophages.

Enfin la GH apparaît impliquée dans d'autres fonctions comme l'appétit, la mémoire, les fonctions cognitives ou le sommeil comme le laisse supposer les améliorations de ces fonctions après traitement par la GH recombinante chez des enfants déficients en GH.

IV. Les somatomédines (IGFs)

Si, *in vivo*, la GH administrée chez des rats hypophysectomisés est capable de réparer les anomalies de la matrice protéique des cartilages, elle est par contre incapable, lorsqu'elle est appliquée directement sur des fragments de cartilage en culture, de stimuler l'incorporation de sulfate à la chondroïtine ; ce que fait un sérum de rat normal. Ces

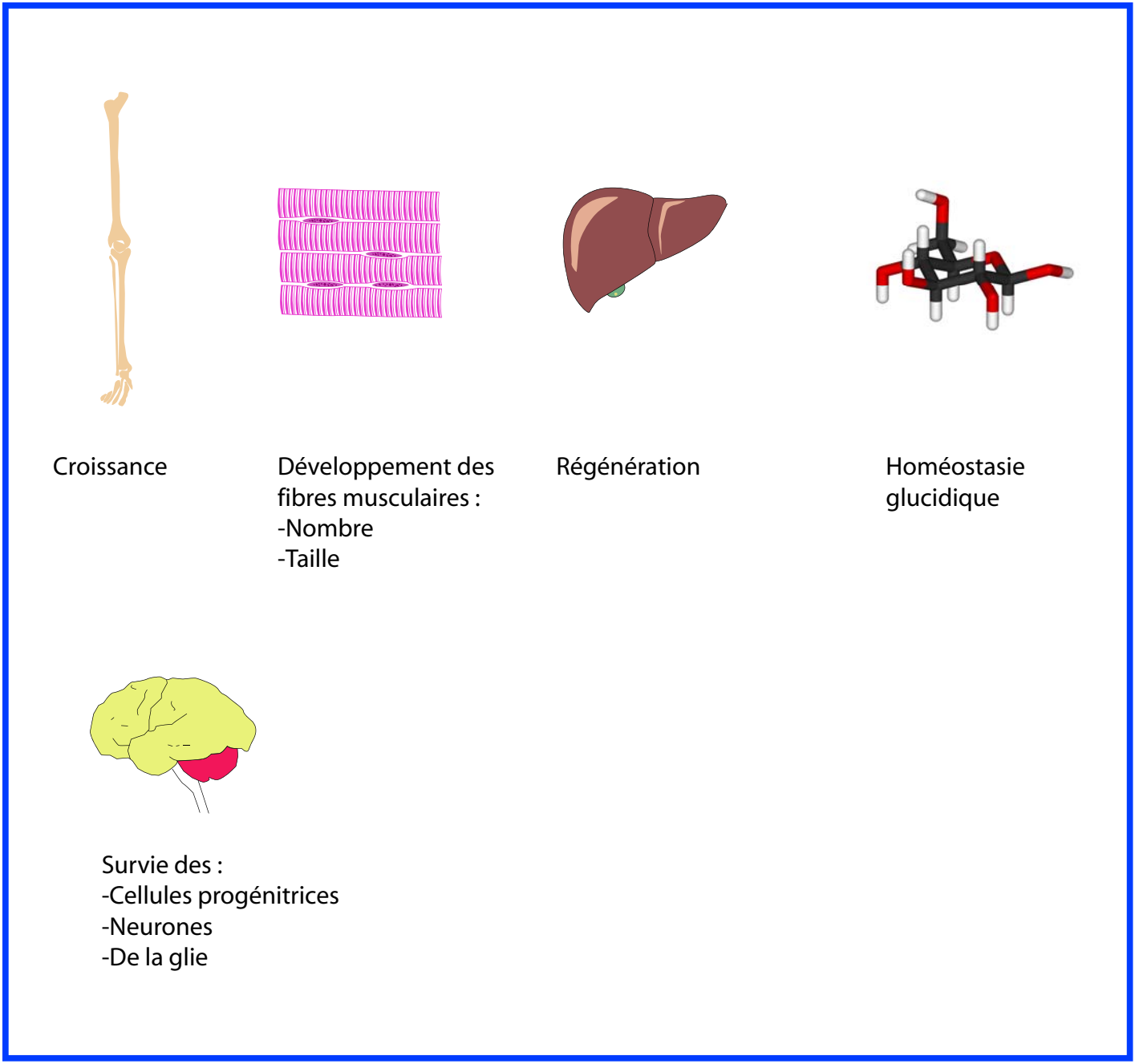
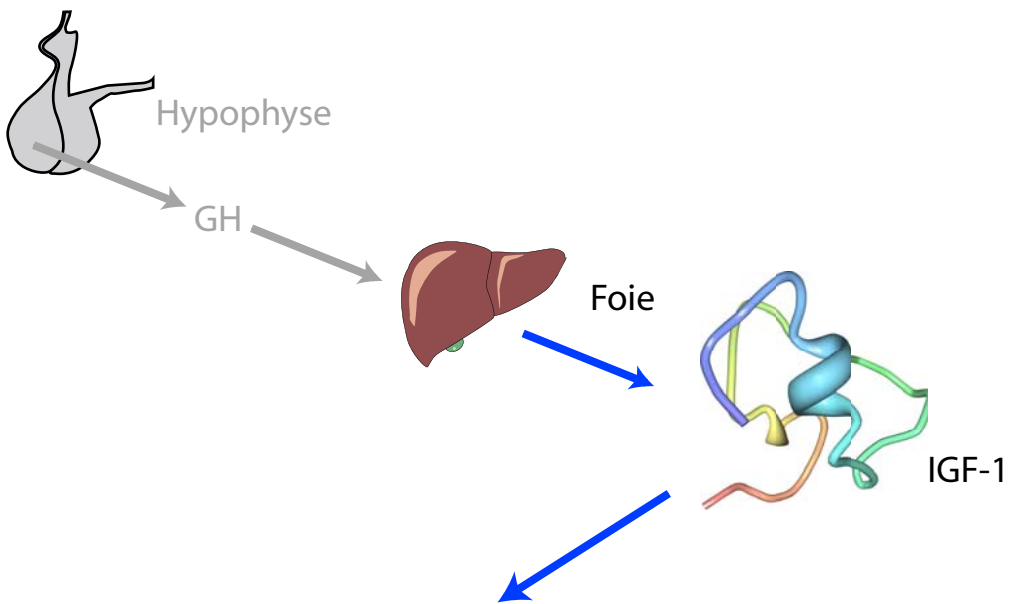


Figure 4 : Effets biologiques de la somatomédine C

observations ont conduit Salmon et Daughaday en 1957 à extraire des fractions protéiques du plasma, les somatomédines, dont il existe deux formes principales IGF1 et IGF2. Celles-ci présentent entre elles 62% d'homologie (Rinderknecht et Humbel, 1978).

Les somatomédines sont principalement sécrétées dans la circulation générale par le foie mais elles sont aussi produites par divers tissus et dans ce cas surtout impliquées dans des régulations locales de type autocrine/paracrine (Yakar *et al.*, 1999) (figure 4).

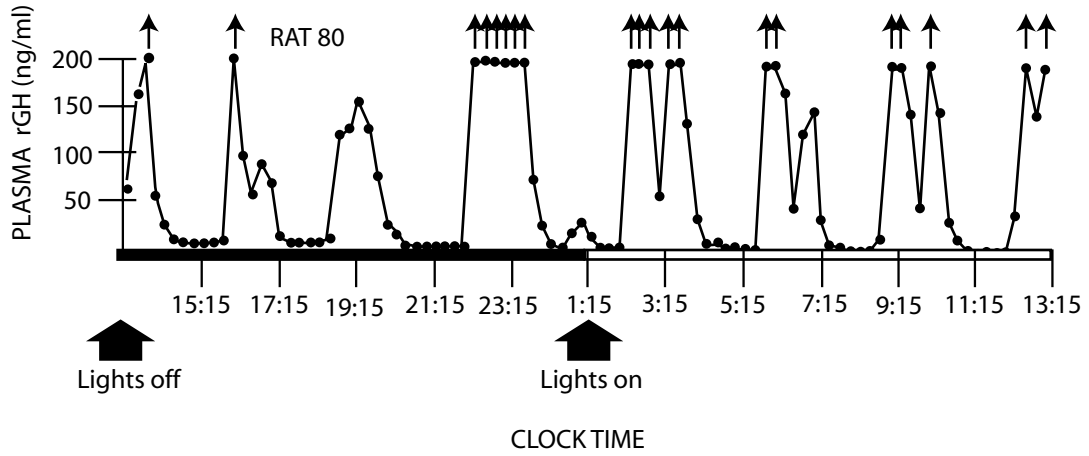
La régulation de la synthèse de l'IGF1 est sous le contrôle étroit de la GH et de la nutrition (Blum *et al.*, 1993; Thissen *et al.*, 1994) ; son taux plasmatique varie avec l'âge (Copeland *et al.*, 1990). Par contre la régulation d'IGF2 par la GH n'est que partielle et sa sécrétion est stable au cours de la vie.

Chez l'homme ou le rongeur une taille réduite est observée lors d'une mutation ou d'une délétion de l'hormone de croissance ou de son récepteur (Charlton *et al.*, 1988; Rosenbloom, 2000; Zhou *et al.*, 1997). Dans ces différents modèles, la croissance est perturbée mais elle n'est pas totalement inhibée et les somatomédines, dont il subsiste une sécrétion basale même en l'absence de GH, compensent dans une certaine mesure la déficience de GH. IGF1 intervient également dans le développement musculaire (il agit à la fois sur la détermination du nombre et de la taille des fibres musculaires) et dans la régénération tissulaire, surtout au niveau du foie (Florini *et al.*, 1996; Schertzer et Lynch, 2006). Il participe à la régulation de l'homéostasie du glucose et chez des enfants ayant des taux d'IGF1 bas il existe généralement une tolérance au glucose anormale et un risque augmenté de diabète de type 2. Enfin l'IGF1 exerce de nombreuses actions sur le système nerveux central, notamment elle favorise la survie des cellules progénitrices des neurones et de la glie (D'Ercole *et al.*, 2002).

V. Mode de sécrétion de l'hormone de croissance

La GH est libérée par les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure dans la circulation générale. Chez tous les mammifères adultes étudiés à l'heure actuelle, cette sécrétion a lieu suivant un rythme ultradien qui dépend du sexe et de l'espèce. D'une manière générale, on observe chez le mâle une alternance entre des phases où la concentration en GH est proche de la limite de détection et des phases où la concentration en GH est élevée et chez la femelle des épisodes sécrétoires plus fréquents mais d'amplitude plus modérée, avec des valeurs basales plus fortes que chez le mâle (Clark *et al.*, 1987; Eden, 1979; Jaffe *et al.*, 1998; van den Berg *et al.*, 1996). Alors que chez le rat mâle les pics sécrétoires qui apparaissent

A



B

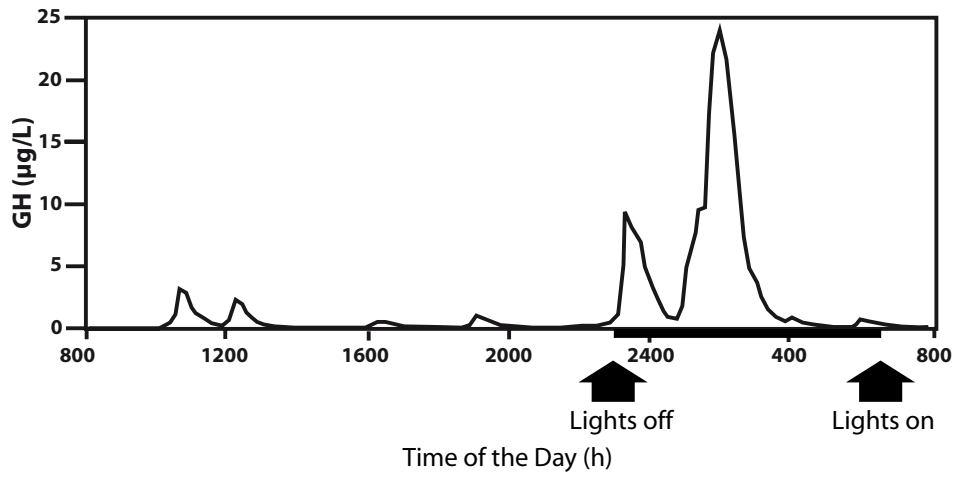


Figure 5 :

A- Profil de sécrétion spontanée de GH chez un rat mâle adulte prélevé pendant 24 heures (D'après Tannenbaum et al., 1976)

B- Profil de sécrétion spontané chez un homme prélevé pendant 24 heures (D'après Jaffe et al., 1988)

toutes les 3h-3h30 sont d'amplitude comparable (Tannenbaum et Martin, 1976), chez l'homme un pic beaucoup plus important et très reproductible est observé dans les premières heures de la nuit en relation avec le sommeil à onde lente (Jaffe *et al.*, 1998; Pringle *et al.*, 1992; Winer *et al.*, 1990). (figure 5)

Cette rythmicité a été particulièrement bien étudiée chez le rat adulte. Chez le rat nouveau né et prépubère, la difficulté d'obtention de prélèvements sanguins itératifs ne permet pas de connaître avec exactitude les étapes de la mise en place de ce rythme. Il semble qu'au cours des 4 premières semaines de vie, la sécrétion soit identique chez le mâle et chez la femelle avec des valeurs basales faibles et de rares pics de faible amplitude (Gabriel *et al.*, 1992). Le dimorphisme apparaîtrait entre le 25^{ème} et le 30^{ème} jour, à la période où l'amplitude des pics augmentent et où les premières différences dans la croissance pondérale entre mâle et femelle sont observées.

Dès l'âge adulte, l'amplitude et la durée des pics de sécrétion commencent à diminuer sans que la périodicité de la sécrétion soit affectée (Sonntag *et al.*, 1980; Takahashi *et al.*, 1987). Chez l'homme, une diminution de 10 à 20% de l'amplitude des pics est observée tous les 10 ans. Cette diminution de la concentration de GH reflète une diminution de l'activité de synthèse des cellules somatotropes (Deslauriers *et al.*, 1991). Elle s'accompagne d'une baisse des taux plasmatiques de somatomédines (De Gennaro Colonna *et al.*, 1994; Deslauriers *et al.*, 1991; Villareal et Morley, 1994).

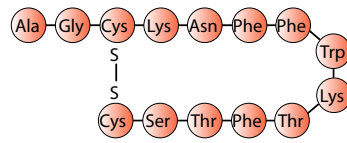
Ce mode de sécrétion épisodique conditionne bon nombre des effets biologiques de la GH. Des études réalisées chez des rats hypophysectomisés montrent que des injections de GH, réalisées de façon rythmique, sont plus efficaces à stimuler la croissance et la production d'IGF-1 que la même quantité d'hormone administrée en bolus (Clark et Robinson, 1985; Isgaard *et al.*, 1988; Maiter *et al.*, 1988). De même chez les enfants déficients en GH, la croissance longitudinale est favorisée lorsque les injections de GH sont fractionnées (Frasier *et al.*, 1978).

VI. Régulation de la sécrétion d'hormone de croissance.

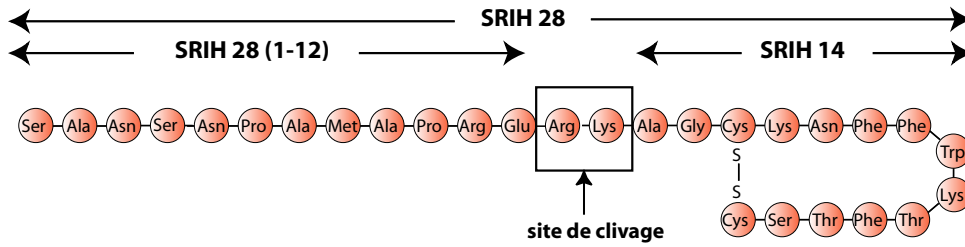
Le contrôle de la sécrétion de GH est assuré principalement par deux neurohormones hypothalamiques, la somatolibérine (GHRH) stimulatrice (Guillemin *et al.*, 1982) et la somatostatine (SRIH) inhibitrice (Brazeau *et al.*, 1973). Ces deux neurohormones sont synthétisées et libérées dans le système porte hypothalamo-hypophysaire par des neurones situés respectivement dans les noyaux arqué et périventriculaire hypothalamiques. Elles sont

A

Somatostatine 14



Somatostatine 28



B

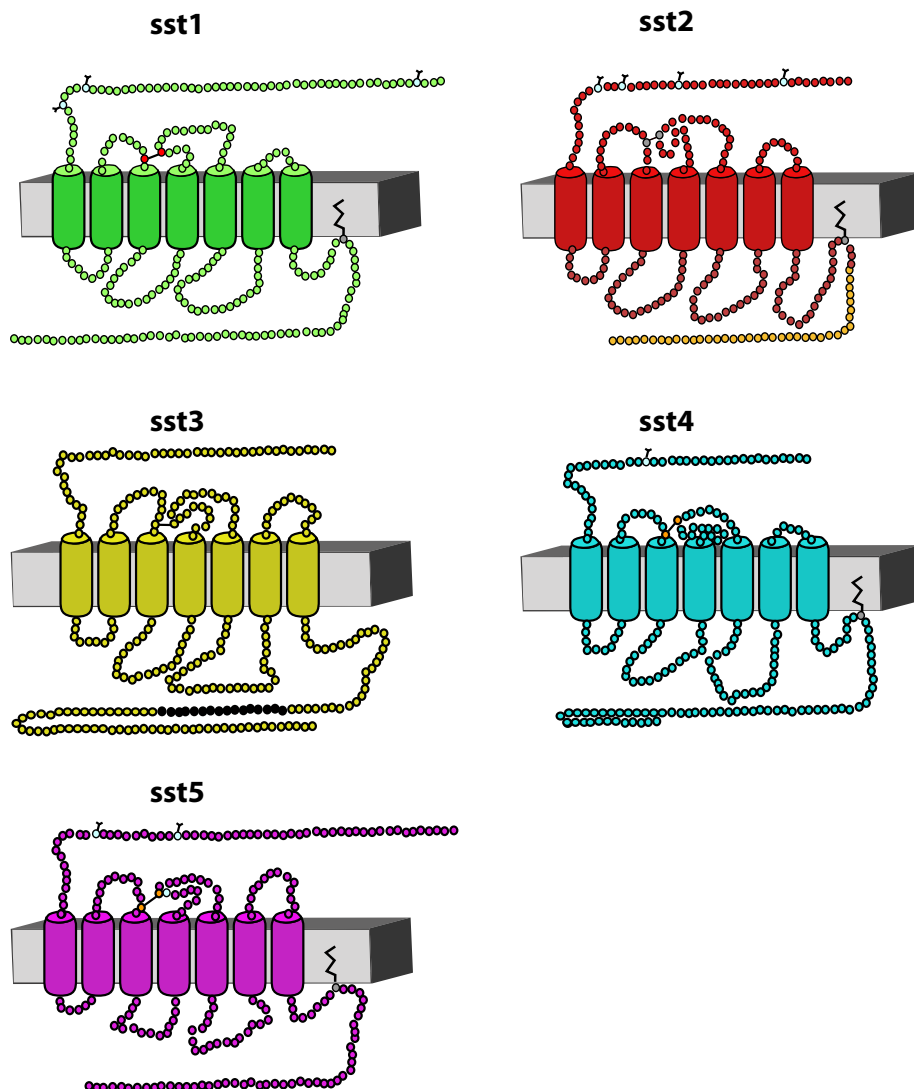


Figure 6 : La somatostatine et ses récepteurs

A- Structure primaire des somatostatines 14 et 28. Les SRIH 14 et 28, qui constituent les deux formes biologiquement actives, sont synthétisées à partir d'un précurseur commun, la pré-pro-somatostatine.

B- Représentation schématique des différents sous-types de récepteurs de la somatostatine. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Leur structure est stabilisée pour tous les sous-types par un pont disulfure symbolisé par un S-S . Tous les récepteurs sont dépourvus d'intron excepté le sous-type sst2 qui possède deux variants d'épissage sst2A (forme longue $\bullet\circ$) et sst2B (forme courte \bullet). Seul le sous-type sst3 ne possède pas de site de palmitoylation indiqué par ζ . Il est également le seul sous-type à posséder une séquence consensus poly-Glu symbolisée par \bullet . Ces récepteurs possèdent également des sites de glycosylation β dans le domaine N-terminal.

elles-mêmes placées sous le contrôle de facteurs produits dans l'hypothalamus ou dans d'autres structures cérébrales ainsi que de facteurs périphériques qui interagissent les uns avec les autres et concourent à assurer une régulation multifactorielle de la sécrétion de l'hormone de croissance.

VI-1. Somatostatine (SRIH)

Dans les années 1960 différentes études avaient montré que certains extraits hypothalamiques étaient capables de stimuler la libération d'hormone de croissance à partir de cellules hypophysaires en culture alors que d'autres l'inhibaient (Krulich *et al.*, 1968). En 1972 alors qu'ils recherchent un facteur stimulant, Brazeau et al (1973) vont isoler à partir d'hypothalami ovins un facteur inhibiteur : la somatostatine. C'est un peptide cyclique qui existe sous deux formes actives : un peptide de 14 acides aminés (somatostatine 14) et un autre de 28 acides aminés allongé du côté N-terminal (somatostatine 28) (figure 6A). Ces 2 peptides sont synthétisés à partir d'un précurseur commun de 113 à 116 acides aminés selon les espèces, la préprosomatostatine (Gomez *et al.*, 1983; Goodman *et al.*, 1983).

La somatostatine est largement distribuée dans le système nerveux central (hypothalamus, cortex, striatum, structures limbiques, tronc cérébral, corne dorsale de la moëlle épinière, rétine) et le tractus gastrointestinal (Arimura *et al.*, 1975; Kiyama et Emson, 1990). Au niveau hypothalamique il existe deux types de neurones somatostatinerigiques (Epelbaum, 1986; Ishikawa *et al.*, 1987; Ohtsuka *et al.*, 1983):

- les neurones à projection longue notamment les neurones hypophysiotropes localisés dans le noyau périventriculaire et l'aire préoptique médiane et projetant vers la zone externe de l'éminence médiane mais aussi des neurones du noyau périventriculaires projetant vers le système limbique et l'encéphale.
- les neurones à projection courte, principalement des interneurones, localisés dans les noyaux : arqué, ventromédian, dorsomédian et suprachiasmatique.

Un autre peptide découvert 23 ans plus tard possède une forte homologie avec la somatostatine (11 acides aminés en commun chez les rongeurs) la cortistatine qui tire son nom de sa localisation au niveau des neurones corticaux (de Lecea *et al.*, 1996).

Les effets biologiques de la somatostatine s'exercent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques. Dans les années qui ont suivi sa découverte des sites de liaison de la somatostatine ont été décrits successivement au niveau d'une lignée de cellules hypophysaires, les GH4C1 (Schonbrunn et Tashjian, 1978), du système nerveux central (Epelbaum *et al.*, 1982), de l'hypophyse (Enjalbert *et al.*, 1982) et de nombreux organes

périphériques (Patel *et al.*, 1995; Reisine et Bell, 1995) et les différences d'affinité pour la somatostatine et ses analogues (octréotide, MK678) ont permis de distinguer deux sous classes de récepteurs nommés SS1 et 2, SRIF 1 et 2, SSA et B, ou SOM A et B selon les études (Mandarino *et al.*, 1981; Raynor et Reisine, 1989; Srikant et Patel, 1981; Tran *et al.*, 1985).

A partir de 1992, soit 20 ans après la découverte de la somatostatine, cinq sous types de récepteurs à la somatostatine : sst1 à 5 vont être clonés chez différentes espèces (Pour revue Moller, 2003). Chez le rat et la souris deux isoformes du récepteur sst2 sont obtenues après épissage alternatif du même gène: une forme longue (sst2A) et une forme tronquée, 23 acides aminés en moins au niveau de la partie C-terminale (sst2B), (Vanetti *et al.*, 1992) (Schindler *et al.*, 1998).(figure 6 B)

Les messagers de ces sous types de récepteurs sont présents dans différentes régions et chaque sous type a une distribution spécifique :

- Au niveau hypothalamique, les messagers sst1, sst2 et sst3 sont abondamment exprimés, le sst2A étant majoritaire (Sarret *et al.*, 1998). Chez le rat l'expression est concentrée au niveau de l'aire préoptique médiane (sst1, 2), des noyaux ventromédian et dorsomédian (sst1, 2, 3), paraventriculaire (sst2), periventriculaire (sst1, 3) et arqué (sst1, 2, 3) (Beaudet *et al.*, 1995; Senaris *et al.*, 1994). Par ailleurs les sous types sst1 et 2 sont synthétisés dans 15 à 20% des neurones à GHRH du noyau arqué (Tannenbaum *et al.*, 1998) et le récepteur sst1 est exprimé dans le noyau périvericulaire au voisinage de ou dans les neurones à SRIH hypophysiotropes (Helboe *et al.*, 1998). Ces localisations sont compatibles avec une implication de ces récepteurs dans le contrôle hypothalamique de la sécrétion de GH. Une augmentation de la sécrétion de GH a par exemple été observée lors de l'inhibition spécifique de l'expression du récepteur sst1 par administration de messagers antisens (Lanneau *et al.*, 2000). Par ailleurs chez des souris délétées pour le gène sst2, la GH stimule toujours cfos dans le noyau périvericulaire mais n'est plus capable d'inhiber l'activité cfos induite par des GH sécrétagogues dans le noyau arqué suggérant une implication des récepteurs sst2 dans le rétrocontrôle négatif exercé par la GH sur les neurones à GHRH de l'arqué (Zheng *et al.*, 1997).

- Au niveau de l'hypophyse antérieure les sous types 1, 2, 3 et 5 sont présents. Chez le rat les récepteurs sst2 et à un moindre degré sst5 contribuent à l'action inhibitrice de la SRIH sur la sécrétion de GH (Parmar *et al.*, 1999) et chez la souris l'utilisation d'animaux délétés pour le récepteur sst1 a permis de montrer que ce sous type jouait également un rôle dans cette sécrétion (Kreienkamp *et al.*, 1999).

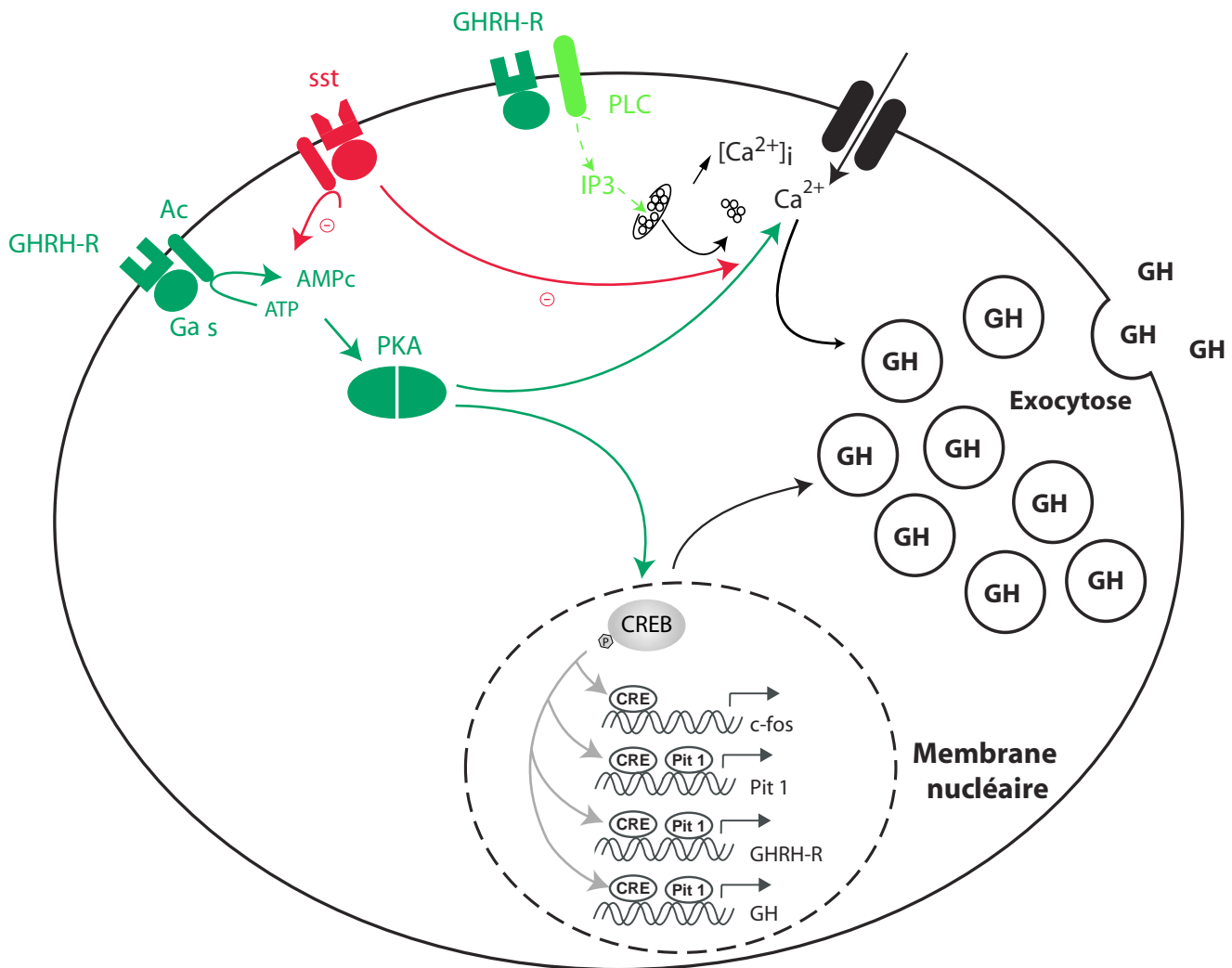


Figure 7: Mécanismes de transduction des récepteurs de la SRIH et de la GHRH mis en jeu dans la cellule somatotrope.

La SRIH, en se liant à ses récepteurs sst, va activer de nombreuses voies de signalisation, mais c'est par la diminution des concentrations intracellulaires en AMPc, et surtout en calcium, qu'elle va relayer son action inhibitrice sur la sécrétion de la GH dans la cellule somatotrope.

La GHRH, en se liant à son récepteur, active la voie de l'adénylate cyclase et la formation d'AMPc qui via la PKA va favoriser l'entrée de calcium dans la cellule par les canaux dépendants du voltage de type L et T et induire l'exocytose des vésicules de GH. De façon plus mineure, la GHRH peut également activer la voie de la PLC qui, via l'IP3, mobilise les stocks intracellulaires de calcium.

La GHRH active également CREB qui, dans le noyau, une fois phosphorylé, induit la transcription de gènes cibles, dont celui de la GH et de la GHRH-R, mais également la prolifération cellulaire via l'activation de c-fos et l'activation du facteur transcriptionnel Pit-1.

Ac: Adénylate cyclase. CREB: cAMP Responsive Element Binding Protein. IP3: Inositol Triphosphate. Pit 1: régulateur de la transcription de la GH. PKA: Protéine kinase A. PLC: Phospholipase C.

A

	1	5	10	15	20	25	30	35	40																																					
Homme	Y	A	D	A	I	F	T	N	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	D	I	M	S	R	Q	Q	G	E	S	N	Q	E	R	G	A	R	A	R	L	a	(1-3)
Rat	H	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	R	I	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	H	E	-	-	N	-	-	-	-	R	-	-	-	-	Q	R	S	-	F	N	(4,5)		
Souris	H	V	-	-	-	-	-	T	N	-	-	-	L	S	-	-	-	Y	-	-	-	-	V	I	-	-	-	N	K	-	-	-	-	R	I	-	-	Q	R	-	-	L	S	(6,7)		

(1) Rivier et al. 1982, (2) Guillemin et al. 1982, (3) Ling et al. 1984, (4) Spiess et al. 1983, (5) Böhlen et al. 1984, (6) Frohman et al. 1989, (7) Suhr et al. 1989, a : amidation, - : acide aminé identique à la séquence humaine

B

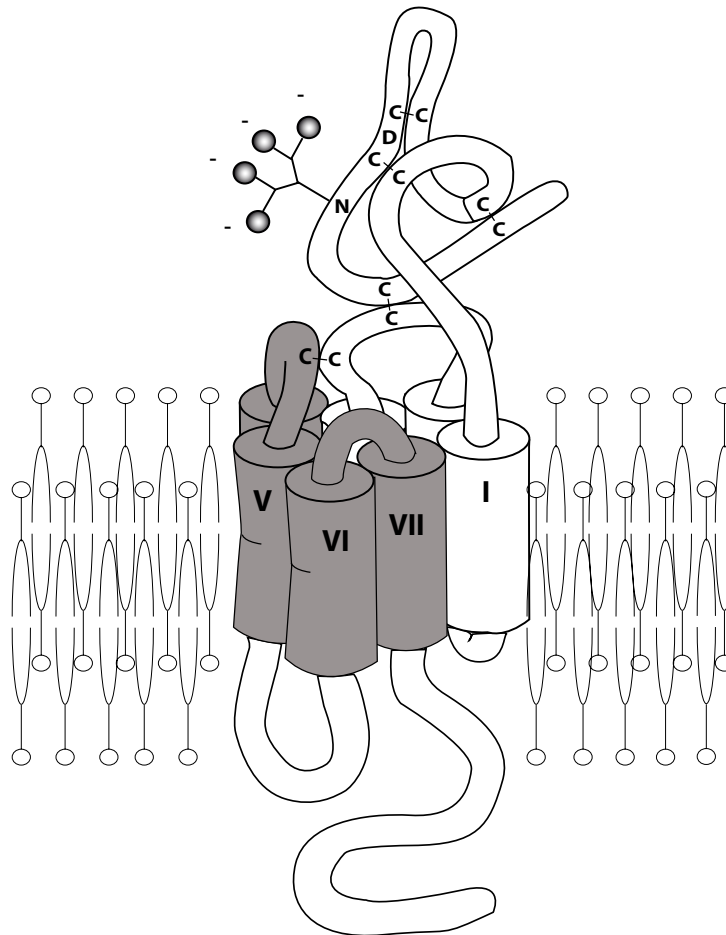


Figure 8 : La GHRH et son récepteur .

A- Comparaison des séquences protéiques de la GHRH chez l'Homme, le Rat, la Souris. Les zones encadrées représentent les acides aminés qui diffèrent de la séquence humaine.

B- Structure protéique du récepteur de la GHRH (d'après Gaylenn et al., 2002). Le récepteur de la GHRH appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires de classe II. Le domaine unique de glycosylation est indiqué en N et le symbole D correspond au site de la mutation de D en G qui altère la liaison du ligand au récepteur.

Les différents sous types possèdent tous une structure à 7 domaines transmembranaires caractéristiques des récepteurs couplés aux protéines G. L'activation de ces récepteurs entraîne la modulation d'une multitude de seconds messagers tels que l'adénylate cyclase, les canaux ioniques calcium et potassium, l'échangeur sodium/proton, la guanylate cyclase, les phospholipases A2 et C, la MAP kinase, la serine et la threonine et la protéine phosphatase phosphotyrosyl (Patel, 1997; Patel *et al.*, 1995; Reisine et Bell, 1995) (figure 7).

La SRIH est, dans un grand nombre d'espèces, un facteur inhibiteur de la sécrétion de GH soit spontanée, soit induite par divers stimuli physiologiques et pharmacologiques. In vitro la SRIH 14 inhibe la sécrétion de GH à partir de cellules antéhypophysaires de rat en culture avec une affinité de l'ordre du nM (Brazeau *et al.*, 1973). In vivo l'administration de SRIH inhibe la sécrétion de GH basale ou induite par l'exercice, l'arginine, l'hypoglycémie (Bratusch-Marrain et Waldhausl, 1979; Brazeau *et al.*, 1973; Di Luigi *et al.*, 1997; Masuda *et al.*, 1990). Par ailleurs le retrait de la SRIH entraîne un rebond de sécrétion de GH aussi bien in vitro qu'in vivo (Kraicer *et al.*, 1986; Miki *et al.*, 1988) ce qui suggère que la SRIH n'interfère pas avec la synthèse de GH. Enfin la SRIH endogène exerce un contrôle inhibiteur tonique sur la sécrétion de GH comme le montre l'augmentation de cette sécrétion observée après immunisation passive avec un anticorps antiSRIH (Painson et Tannenbaum, 1991) ou après lésion du noyau périventriculaire (Critchlow *et al.*, 1981; Critchlow *et al.*, 1978).

VI-2. Somatolibérine (GHRH)

La somatolibérine a été isolée à partir d'une tumeur pancréatique ectopique provenant d'un patient acromégale (Guillemin *et al.*, 1982; Rivier *et al.*, 1982) puis identifiée au niveau de l'hypothalamus de rat (Spiess *et al.*, 1983) et d'homme. Elle appartient à la famille du glucagon, de la sécrétine, du peptide vasoactif intestinal (VIP) et du peptide activateur de l'adénylate cyclase pituitaire (PACAP). Chez l'homme la GHRH existe sous 2 formes de 40 et 44 acides aminés. La forme présumée mature est celle de 44 acides aminés possédant une extrémité C terminale amidée (figure 8A). Chez le rat la séquence de la GHRH ne comporte que 43 acides aminés et l'extrémité C terminale n'est pas amidée contrairement aux autres espèces (Spiess *et al.*, 1983).

Alors que la somatostatine présente une distribution ubiquitaire, les neurones exprimant la GHRH se situent exclusivement au niveau de l'hypothalamus médiobasal, dans le noyau arqué et autour du noyau ventromédian (Jacobowitz *et al.*, 1983). Les fibres provenant du noyau arqué projettent au niveau de la couche externe de l'éminence médiane

(Niimi *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1984). Quelques fibres projettent également vers les noyaux périventriculaire, paraventriculaire et dorsomédian ainsi que vers l'aire préoptique (Sawchenko *et al.*, 1985).

Le récepteur de la somatolibérine fait partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires (figure 8B). Il a été cloné chez l'homme, le rat et la souris (Gaylinn *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1992; Mayo, 1992). Au niveau central ce récepteur est faiblement exprimé au niveau des noyaux périventriculaire, arqué et ventromédian de l'hypothalamus antérieur (Takahashi *et al.*, 1995). En périphérie il est principalement localisé au niveau des cellules somatotropes de l'hypophyse (Gaylinn *et al.*, 1993), mais il est également retrouvé dans le rein, la glande thyroïde, le coeur, les poumons, le duodénum, le petit et le gros intestin, la rate, les surrénales, l'uretère et le muscle squelettique (Matsubara *et al.*, 1995).

La fixation de la GHRH sur son récepteur entraîne une augmentation de l'AMP cyclique et du calcium intracellulaire, de la transcription du gène de la GH via l'activation du facteur de transcription comme pit-1 et de l'exocytose des granules de sécrétion (Bodner et Karin, 1987; Draznin *et al.*, 1988; Mayo, 1992; Merritt *et al.*, 1984) (figure 7)

La GHRH accroît la prolifération des cellules somatotropes (Billestrup *et al.*, 1986), stimule la synthèse (Barinaga *et al.*, 1985) et la sécrétion de GH à partir de cellules hypophysaires en culture (Brazeau *et al.*, 1982). In vivo la sécrétion de GH n'est fortement stimulée par la GHRH exogène que lorsque cette dernière est appliquée au cours d'un épisode sécrétoire c'est-à-dire en période de faible tonus en somatostatinergique (Tannenbaum et Ling, 1984). Enfin le contrôle de l'amplitude des pics de sécrétion spontanée de GH est sous la dépendance de la GHRH endogène. En effet l'administration d'anticorps spécifiques dirigés contre la GHRH ou encore une lésion électrolytique du noyau arqué détruisant les neurones élaborant la GHRH abolissent les pics de GH (Maiter *et al.*, 1991; Rabii *et al.*, 1984; Wehrenberg *et al.*, 1982).

VI-3. Interactions intrahypothalamiques SRIH-GHRH

Même s'il existe peu de connections directes entre neurones à SRIH du noyau périventriculaire et neurones à GHRH du noyau arqué (Fodor *et al.*, 1994; Willoughby *et al.*, 1989), de nombreuses données expérimentales sont en faveur d'interactions entre ces neurones :

- La GHRH est capable de moduler la libération de SRIH : Des injections intracérébroventriculaires de GHRH induisent une inhibition de la sécrétion de GH via

une augmentation des taux de SRIH au niveau du système porte hypothalamo-hypophysaire (Mitsugi *et al.*, 1990). Cet effet peut être antagonisé par l'administration d'un anticorps dirigé contre la SRIH (Katakami *et al.*, 1986). De plus in vitro la GHRH a un effet stimulateur sur la libération de SRIH à partir de cellules hypothalamiques en culture (Richardson *et al.*, 1988).

- Et la SRIH est capable de moduler la libération de GHRH : L'immuno-neutralisation de la SRIH (Plotsky et Vale, 1985), sa déplétion au niveau de l'hypothalamus (Tannenbaum *et al.*, 1990), ou la lésion de l'aire préoptique médiane, riche en corps cellulaires somatostatinerigiques (Katakami *et al.*, 1988), entraînent une augmentation des concentrations de GHRH. Parallèlement, la SRIH injectée en intracérébroventriculaire à des rats vigiles (Lumpkin *et al.*, 1981) est capable de stimuler la libération de GH. Cette réponse est due à une élévation des taux de GHRH, puisqu'elle est bloquée par des anti-corps dirigés contre la GHRH (Murakami *et al.*, 1987)

La communication entre ces deux populations neuronales pourrait faire intervenir des neurones relais. D'un point de vue anatomique les candidats potentiels pour jouer ce rôle pourraient être les neurones à β -endorphine et à galanine du noyau arqué, puisqu'un marqueur rétrograde injecté au niveau du noyau périventriculaire est capable de marquer ces populations neuronales (Fodor *et al.*, 1994) et les neurones à NPY du noyau arqué puisque des terminaisons axonales ont été décrites à proximité des neurones à SRIH du noyau périventriculaire (Hisano *et al.*, 1990). Par ailleurs les interneurones à somatostatine présents au niveau du noyau arqué et au contact avec les neurones à GHRH (Liposits *et al.*, 1988) pourraient également être impliqués

Enfin des données sont en faveur d'un autocontrôle exercé par SRIH et GHRH sur leur propre sécrétion :

- présence de fibres à SRIH (Alonso *et al.*, 1985) et à GHRH (Horvath et Palkovits, 1988) au contact de leurs corps cellulaires respectifs
- inhibition de la SRIH par des agoniste synthétiques de la SRIH (Peterfreund et Vale, 1984) et stimulation de la GHRH après immunisation passive de la GHRH (Uchiyama *et al.*, 1994)

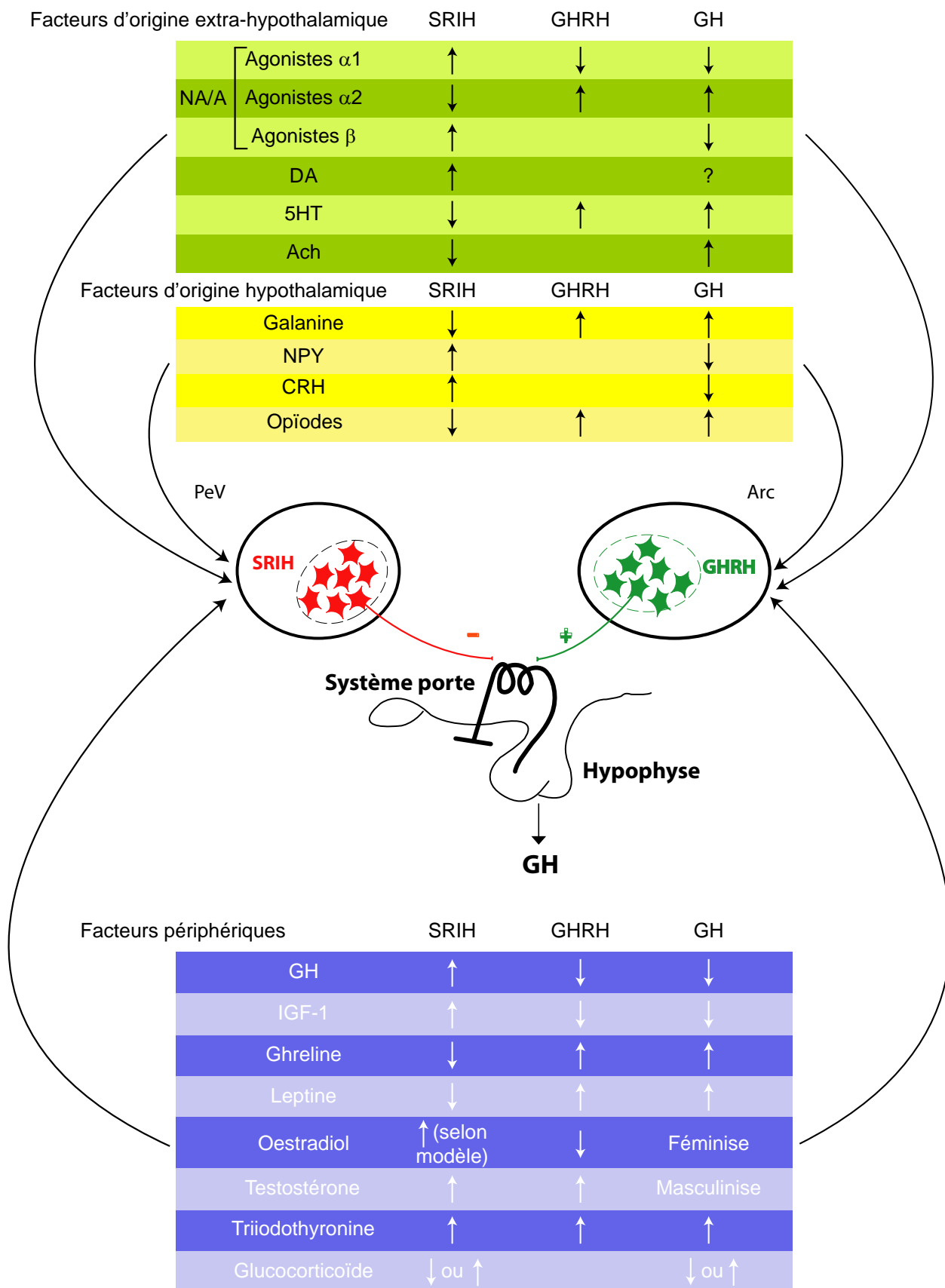


Figure 9 : Principaux facteurs d'origine hypothalamique (encadré jaune), extrahypothalamique (encadré vert) et périphériques (encadré bleu) impliqués dans la régulation de la sécrétion de GH

SRIH : somatostatine, GHRH : somatolibérine, GH : hormone de croissance, NA : noradrénaline, A : adrénaline, DA : dopamine,

5HT : sérotonine, Ach : acétylcholine, NPY : neuropeptide Y, CRH : corticolibérine, IGF1 : somatomédine C (Insulin like growth factor 1), PeV : noyau hypothalamique périvericulaire, Arc : noyau hypothalamique arqué.

VI-4. Autres facteurs centraux et périphériques impliqués dans la régulation de la sécrétion de GH

De nombreux autres facteurs hypothalamiques mais également des neurotransmetteurs et des signaux périphériques et métaboliques participent à la régulation de la sécrétion de GH en contrôlant la libération de GHRH et de SRIH et/ou en modulant directement la libération de GH au niveau de la cellule somatotrope. Les principaux d'entre eux sont présentés sur la figure 9

VI-4-a. Facteurs centraux

- La **galanine**, un peptide de 29 acides aminés extrait et purifié à partir d'intestin de porc (Tatemoto *et al.*, 1983), existe également dans les neurones du système nerveux central avec une densité particulièrement élevée dans l'hypothalamus, notamment dans la partie ventrolatérale de l'aire préoptique médiane et les noyaux arqué, paraventriculaire, supraoptique et dorsomédian (Melander *et al.*, 1986). Des techniques de double marquage immunohistochimique montrent que dans le noyau arqué la galanine est présente dans la même population neuronale que la GHRH (Hulting *et al.*, 1991; Niimi *et al.*, 1990). Par ailleurs de nombreuses terminaisons axonales à galanine sont présentes à proximité des neurones à SRIH du noyau périventriculaire et des études de flux rétrograde révèlent qu'elles proviennent en partie du noyau arqué (Fodor *et al.*, 1994; Liposits *et al.*, 1993).

Chez le rat l'administration intracérébrale de galanine stimule la sécrétion de GH. Cet effet serait dû à une modulation à la fois de la libération de GHRH et de celle de SRIH. En effet 1) la libération de GHRH à partir d'explants hypothalamiques périfusés *in vitro* est augmenté par la galanine et un prétraitement par un anticorps spécifique de la GHRH abolit la réponse GH à la galanine et 2) la galanine ne stimule plus la sécrétion de GH chez des animaux dont le tonus somatostatinergique est inhibé par administration d'anticorps (Tanoh *et al.*, 1993).

Alors que de nombreuses fibres immunoréactives à la galanine ont été mises en évidence au niveau de l'éminence médiane (Palkovits *et al.*, 1987) et que la galanine ne semble pas présente dans le sang porte (Clarke *et al.*, 1993), un effet direct de la galanine hypothalamique au niveau hypophysaire n'a jamais été clairement montré.

- Le **neuropeptide Y (NPY)**, un peptide de 36 acides aminés isolé à partir de cerveau de porc (Tatemoto *et al.*, 1982), est largement distribué dans le système nerveux central, les plus fortes concentrations étant observées dans les noyaux arqué et paraventriculaire hypothalamiques (Abe *et al.*, 1990; Danger *et al.*, 1990).

Le NPY exerce un effet inhibiteur important sur la sécrétion de GH. En effet l'administration ICV de NPY inhibe totalement les pics spontanés de GH (Pierroz *et al.*, 1996) et à l'inverse celle d'un anticorps dirigé contre le NPY les augmente (Rettori *et al.*, 1990). L'existence de connexions anatomiques directes entre NPY et SRIH (Hisano *et al.*, 1990) suggère une stimulation de la libération de SRIH par le NPY comme montrée *in vitro* (Rettori *et al.*, 1990).

- La **corticolibérine** (CRH), peptide de 41 acides aminés isolé à partir d'hypothalamus de mouton pour sa capacité à stimuler la sécrétion d'hormone corticotrope (Spiess *et al.*, 1981) est synthétisée dans différentes régions du système nerveux central, particulièrement dans la partie parvocellulaire du noyau paraventriculaire hypothalamique (Swanson *et al.*, 1983).

La CRH diminue la libération de GH basale ou stimulée par la GHRH (Ono *et al.*, 1984) (Barbarino *et al.*, 1990). Par ailleurs les pics de GH sont augmentés après administration intracérébrale d'un antagoniste de la CRH, suggérant une modulation négative de la sécrétion spontanée de GH par la CRH endogène (Mounier *et al.*, 1997). Cet effet négatif de CRH est en partie dû à une stimulation de la libération de SRIH car il est aboli par un prétraitement avec un anticorps anti SRIH (Katakami *et al.*, 1985). D'ailleurs il existe des connexions entre neurones à CRH et neurones à SRIH (Hisano et Daikoku, 1991) et l'administration ICV de CRH induit une augmentation de la libération de SRIH dans le sang porte (Mitsugi *et al.*, 1990).

- La **proopiomelanocortine** (POMC), protéine dont le clivage donne naissance à plusieurs peptides : les mélanotropines, les endorphines, l'hormone corticotrope (ACTH) et le peptide de la famille des corticotropes du lobe intermédiaire (CLIP), est synthétisée notamment dans le noyau arqué hypothalamique et dans le noyau du tractus solitaire (Tranchand-Bunel *et al.*, 1987). Chez le rat l'administration de certains de ces peptides comme l' α MSH ou la β endorphine entraîne une augmentation des concentrations plasmatiques de GH (Rivier *et al.*, 1977; Strauch *et al.*, 1973) (Bruni *et al.*, 1977). Cet effet serait le résultat d'une modulation de la libération de SRIH et de GHRH. Les neurones et POMC du noyau arqué sont connectés à la fois aux neurones à GHRH de l'ARC (Daikoku *et al.*, 1988) et aux neurones à SRIH du noyau périventriculaire (Fodor *et al.*, 1994) et il a été montré que a) la neutralisation de la GHRH endogène par un anticorps spécifique abolit la réponse GH à ces peptides (Miki *et al.*, 1984) et que b) certains de ces peptides sont capables d'inhiber la libération de SRIH induite par dépolarisation dans un modèle d'explants

hypothalamiques périfusés (Drouva *et al.*, 1981).

- D'autres neuropeptides interviennent également dans la régulation de la sécrétion de GH. Citons la substance P qui a selon les études une action stimulatrice (Coiro *et al.*, 1992; Rivier *et al.*, 1977) ou inhibitrice au niveau hypothalamique (Arisawa *et al.*, 1989; Eckstein *et al.*, 1980), le peptide vasoactif intestinal (Fazekas *et al.*, 2000), et le peptide activateur de l'adénylate cyclase pituitaire (Goth *et al.*, 1992) qui ont une action stimulatrice directement au niveau hypophysaire et la thyroïdolibérine qui a une action inhibitrice au niveau hypothalamique et stimulatrice au niveau hypophysaire (Szabo *et al.*, 1985; Williams *et al.*, 1985).

- Les **neurotransmetteurs** dont les principaux effets sont résumés sur la figure 9

VI-4-b. Facteurs d'origine périphériques

La sécrétion de GH est sous l'influence de nombreux facteurs périphériques : la GH et les IGF1 qui exercent un rétrocontrôle négatif, les hormones gonadiques, les hormones corticosurréaliennes, les hormones thyroïdiennes, les cytokines, les facteurs nutritionnels et métaboliques. Dans cette introduction, par soucis de concision, nous ne détaillerons que les effets de la GH, l'IGF-1 et la leptine, les effets des autres facteurs sont résumés sur la figure 9

- L'administration de **GH** en IV (Clark *et al.*, 1988; Willoughby *et al.*, 1980) ou ICV (Abe *et al.*, 1983; Tannenbaum, 1980) diminue l'amplitude des pics de GH et l'effet inverse est observé après administration soit d'un antagoniste du récepteur GH (Nass *et al.*, 2000) soit d'un oligonucléotide antisens dirigé contre l'ARNm de ce récepteur (Pellegrini *et al.*, 1996).

Le rétrocontrôle négatif de l'hormone de croissance sur sa propre sécrétion implique à la fois une augmentation de la sécrétion de SRIH et une diminution de celle de GHRH. Chez le rat l'implantation de cellules tumorales GC qui sécrètent la GH de manière chronique entraîne une augmentation de l'expression de la SRIH au niveau du PeV et une diminution de celle de la GHRH au niveau de l'ARC (Bertherat *et al.*, 1993). De même l'administration de GH recombinante peut entraîner soit une augmentation de l'activité (Rogers *et al.*, 1988) et de la libération (Chihara *et al.*, 1981; Lanzi et Tannenbaum, 1992) de SRIH, soit une diminution de la synthèse (Chomczynski *et al.*, 1988) et de la libération (Clark *et al.*, 1988) de GHRH ou les deux à la fois (Miki *et al.*, 1989). Enfin une synthèse accrue de GHRH est

décrite dans certaines souches mutantes de souris et des rats déficients en GH (Hurley, 1998 ; Frohman, 1989 ; Kamegai, 1998)

L'action de la GH sur la libération de SRIH est un effet direct relayé par les récepteurs GH présents sur les neurones somatostatinerigiques du PeV (Burton *et al.*, 1992; Lobie *et al.*, 1993; Minami *et al.*, 1993; Pellegrini *et al.*, 1996). En revanche son effet sur la libération de GHRH est indirect. Il pourrait impliquer les neurones à NPY qui expriment le récepteur GH (Kamegai *et al.*, 1996) car il a été montré que l'administration systémique de GH à des animaux hypophysectomisés induisait une activation des cellules NPY de l'arcué (Chan *et al.*, 1996; Kamegai *et al.*, 1994).

Enfin la rétroaction de la GH contribue à la génération de la rythmicité de sa sécrétion puisque le blocage partiel de la synthèse du récepteur GH conduit à une augmentation de la fréquence des pics.

- Les **IGF-1** en synergie avec l'hormone de croissance exercent un rétrocontrôle inhibiteur sur la sécrétion de GH. Ce rétrocontrôle pourrait s'exercer à la fois au niveau hypophysaire et peut être au niveau hypothalamique. Des récepteurs de l'IGF-1 ont été mis en évidence au niveau de l'hypophyse (Rosenfeld *et al.*, 1984) et in vitro l'IGF-1 diminue à la fois l'expression du gène codant pour la GH et la sécrétion basale ou stimulée de GH par des cellules hypophysaires en culture (Yamashita et Melmed, 1986). Au niveau central, l'administration concomitante d'IGF1 et 2 supprime les pics de sécrétion spontanée de GH (Harel et Tannenbaum, 1992). Cet effet impliquerait l'activation des neurones SRIH et l'inhibition des neurones GHRH comme le suggèrent les effets observés in vitro lors de l'application d'IGF1 dans une périfusion d'explants hypothalamiques (Berelowitz *et al.*, 1981; Shibasaki *et al.*, 1986) et serait indépendant de l'effet de la GH puisque chez le rat déficient en GH, l'administration d'IGF1 induit une diminution modérée des ARN-m pour GHRH et une augmentation des ARN-m de la SRIH (Sato et Frohman, 1993).

Enfin, étant donné qu'il n'existe pas de variation ultradienne de la sécrétion d'IGF-1, il est peu probable que ce dernier participe à la genèse de la rythmicité de la sécrétion de GH.

- La **leptine** est une hormone anorexigène qui a été découverte en 1994 lorsque le gène responsable de l'obésité chez les souris ob/ob a été cloné (Zhang *et al.*, 1994). Elle est principalement sécrétée par les adipocytes et elle renseigne le cerveau sur l'état des réserves lipidiques périphériques comme nous le verrons dans le chapitre II.

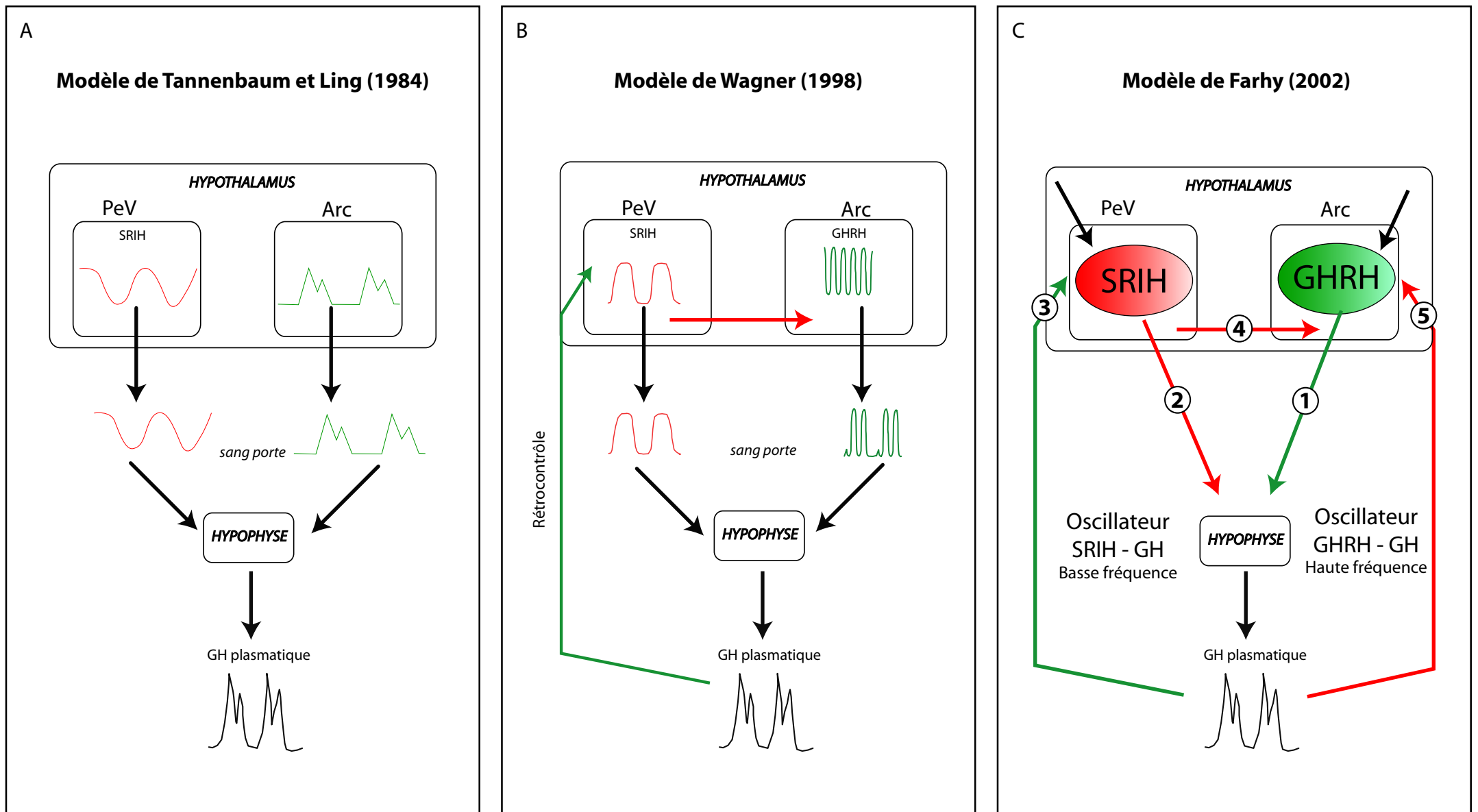


Figure 10 : Modèles hypothétiques du contrôle de la sécrétion d'hormone de croissance.

A- La libération tonique de GHRH dans le sang porte est en antiphasé avec celle de la SRIH, ce qui conduit à la sécrétion épisodique de la GH dans la circulation générale.

B- La GHRH possède un rythme endogène d'une fréquence d'environ une heure. Le rétrocontrôle négatif exercé par la GH sur les neurones à SRIH du noyau périvericulaire va imposer une période de 3,3 heures. Dans ce modèle, la modulation du rythme endogène de la GHRH via le contrôle somatostatinergerique qui s'exerce centralement sur les neurones à GHRH du noyau arqué imposerait le rythme de la sécrétion de la GH.

C- Les différentes interactions régulatrices mises en jeu sont représentées pour les influences inhibitrices par des flèches rouges et pour les influences stimulatrices par des flèches vertes. Les interactions prises en compte pour l'élaboration du modèle sont numérotées de 1 à 5 avec: 1- la stimulation de la sécrétion de la GH par la GHRH, 2- l'inhibition de la sécrétion de la GH par la SRIH, 3- le rétrocontrôle positif de la GH qui s'exerce sur les neurones à SRIH du PeV, 4- l'inhibition par les neurones à SRIH des neurones à GHRH, et enfin 5- le rétrocontrôle négatif de la GH sur les neurones à GHRH. Dans ce modèle, la dynamique de la sécrétion de la GH met en jeu deux oscillateurs non autonomes que constituent les interactions GHRH-GH, oscillateur de haute fréquence (40-60 min), et les interactions SRIH-GH, oscillateur de basse fréquence, qui génèrent les volées sécrétoires toutes les 3,3 heures.

La leptine exogène a un effet stimulateur sur la sécrétion de GH (Tannenbaum *et al.*, 1998). La leptine endogène apparaît nécessaire pour assurer la sécrétion épisodique de GH puisque chez les souris ob/ob (déficientes en leptine) ou db/db (mutation du gène du récepteur de la leptine) ou chez les rats nourris ad libitum traités par un antiserum dirigé contre la leptine la sécrétion de GH est très diminuée (Carro *et al.*, 1997; Larson *et al.*, 1976; Sinha et Baxter, 1978). Inversement la leptine est capable d'antagoniser l'effet inhibiteur de la restriction alimentaire sur la sécrétion de GH (Carro *et al.*, 1997).

La leptine agit aussi bien au niveau hypophysaire qu'au niveau hypothalamique. Chez l'homme et chez le rongeur, la leptine et son récepteur sont présents au niveau de l'hypophyse et chez le cochon, la leptine augmente la sécrétion de GH à partir de cellules hypophysaires probablement via la stimulation de l'oxyde d'azote (Baratta *et al.*, 2002). Au niveau de l'hypothalamus, la leptine semble agir en diminuant la libération de SRIH et en augmentant celle de GHRH. En effet l'incubation de neurones hypothalamiques en présence de leptine entraîne une diminution de la SRIH libérée dans le milieu et de son ARNm cellulaire (Quintela *et al.*, 1997), l'administration de leptine à des rats jeûneurs hypophysectomisés induit une augmentation des ARNm de GHRH et une diminution de ceux de SRIH (Carro *et al.*, 1999) et la réponse GH à la leptine est bloquée après administration d'anticorps dirigés contre la GHRH mais augmentée après administration d'un antiserum dirigé contre la SRIH, (Carro *et al.*, 1999).

VI- 5. Modèles mathématiques du contrôle de la sécrétion de GH. (figure 10)

Le premier modèle a été proposé en 1984. A cette date plusieurs observations semblaient indiquer que la SRIH non seulement contrôlait les valeurs basales de GH mais était aussi à l'origine de l'initiation des pics de GH, la GHRH quant à elle n'intervenant que dans la modulation de l'amplitude de ces pics. En effet une immunisation passive contre la SRIH d'une part augmente les valeurs basales de GH sans modifier ni la fréquence, ni l'amplitude des pics de sécrétion et d'autre part permet une réponse constante de GH à la GHRH exogène alors qu'en l'absence de ce traitement la réponse dépend de la période où a lieu l'injection (réponse importante lorsque l'injection a lieu durant un pic mais très faible lorsque l'injection a lieu durant la période basale) (Tannenbaum et Ling, 1984). En se basant sur ces résultats Tannenbaum et Ling ont élaboré un modèle dans lequel SRIH et GHRH seraient libérées de façon pulsatile et en opposition de phase (Tannenbaum et Ling, 1984), la libération de GHRH dans le sang porte hypophysaire étant en phase avec celle de GH alors

qu'elle est en antiphase avec celle de SRIH. Chez le rat anesthésié par la kétamine la collecte de sang porte hypophysaire, confortera ce modèle, puisqu'elle montre que les taux de GHRH sont maximaux quand ceux de SRIH sont minimaux (Plotsky et Vale, 1985). Ces résultats ne seront jamais reproduits dans d'autres études. Chez la brebis non anesthésiée et ovariectomisée, par exemple, la GHRH et la SRIH sont sécrétées de façon épisodique, mais s'il existe bien une association entre pics de GH et pics de GHRH il n'en existe pas avec les trous de SRIH (Frohman *et al.*, 1990). De plus si ce modèle est compatible avec les profils de sécrétion observés chez le rat mâle notamment, il rend plus difficilement compte de ceux à fréquence irrégulière décrits chez la femelle.

A partir de ce modèle d'autres plus complexes, prenant en compte différents partenaires, vont être proposés. Celui de Wagner et al (Wagner *et al.*, 1998) intègre d'une part le rétrocontrôle exercé par la GH et d'autre part le fait que la somatostatine agit directement au niveau de la cellule somatotrope mais également au niveau hypothalamique, où elle va moduler l'activité des neurones à GHRH. Dans ce modèle le rythme endogène de libération de SRIH aurait une fréquence de 3 heures alors que celui de GHRH aurait une fréquence intrinsèque de 1 heure.

Plus récemment Farhy et Veldhuis ont développé des algorithmes permettant de modéliser le dimorphisme de la sécrétion de GH (Farhy *et al.*, 2002). Ce modèle prend en compte :

- La stimulation de la sécrétion de GH par la GHRH
- L'inhibition de la sécrétion de GH par la SRIH
- Le rétrocontrôle positif de la GH sur les neurones à SRIH
- L'inhibition des neurones à GHRH par la SRIH
- Le rétrocontrôle négatif de la GH sur la GHRH

Il existerait deux oscillateurs non autonomes, un de haute fréquence (40-60 minutes) correspondant aux interactions GHRH-GH et un autre de basse fréquence correspondant aux interactions SRIH-GH. L'irrégularité des pics sécrétoires chez la femelle serait due à une augmentation de la variabilité de la libération de SRIH qui introduirait une variabilité dans le processus de libération de GH, une altération de l'oscillateur GH-SRIH et l'émergence d'oscillations de hautes fréquences

Dans une étude récente, Mac Gregor développe un modèle comparable à celui de Farhy et Veldhuis et montre qu'il existe une bonne adéquation entre les résultats obtenus dans son modèle et ceux obtenus expérimentalement (MacGregor et Leng, 2005).

Toutes ces données montrent que les mécanismes qui président au contrôle de la sécrétion rythmique de GH sont pléiotypiques et donc extrêmement complexes. Ils mettent en jeu des facteurs dont certains sont prédominants (comme par exemple la GHRH) et leur défaillance entraîne généralement des troubles majeurs et dont d'autres (comme par exemple certains neuropeptides ou les hormones surrénaliennes) semblent plus liés à des réglages fins permettant d'adapter la sécrétion de l'hormone à des conditions physiologiques ou pathologiques particulières. Néanmoins ces mécanismes ne sont pas totalement élucidés, notamment, comme nous l'avons vu, ceux qui assurent la coordination entre les deux systèmes de neurones oscillateurs que sont les neurones à SRIH et les neurones à GHRH ne sont pas encore bien définis.

B) COMPORTEMENT ALIMENTAIRE

Le comportement alimentaire a pour but d'assurer l'apport en substrats énergétiques et en composés biochimiques nécessaires à l'ensemble des cellules de l'organisme. Il fait partie d'un ensemble complexe de processus qui participent à la régulation de l'homéostasie énergétique, procédé par lequel les réserves de l'organisme, stockées essentiellement dans les tissus adipeux, sont maintenues à l'équilibre au cours du temps.

Le comportement alimentaire se caractérise par des épisodes discontinus de prise alimentaire, chaque épisode comprenant 3 phases :

- une phase pré-ingestive durant laquelle se manifeste la sensation de faim
- une phase prandiale correspondant à la période de prise alimentaire et au processus progressif de rassasiement
- une phase post-prandiale qui se caractérise par un état de satiété et durant laquelle il n'y aura pas d'autre épisode alimentaire

La régulation des apports alimentaires peut se faire par une modulation de :

- la quantité d'aliments ingérés au cours d'un épisode alimentaire
- l'intervalle entre deux prises alimentaires

Cette régulation dépend également de facteurs environnementaux comme la disponibilité alimentaire et, chez l'homme, de paramètres sociaux culturels, comme l'heure des repas et les impératifs professionnels.

Le contrôle de la prise alimentaire se fait au niveau du système nerveux central (SNC). L'hypothalamus joue un rôle clé dans cette régulation mais d'autres structures sont également impliquées :

1. le noyau du tractus solitaire sur qui convergent les informations d'origine vagale
2. le noyau parabrachial
3. le thalamus qui joue un rôle dans la perception hédonique
4. les structures du lobe temporal
5. le système limbique qui est impliqué dans les processus d'apprentissage et de conditionnement

Dans cette introduction nous nous focaliserons sur le contrôle hypothalamique.

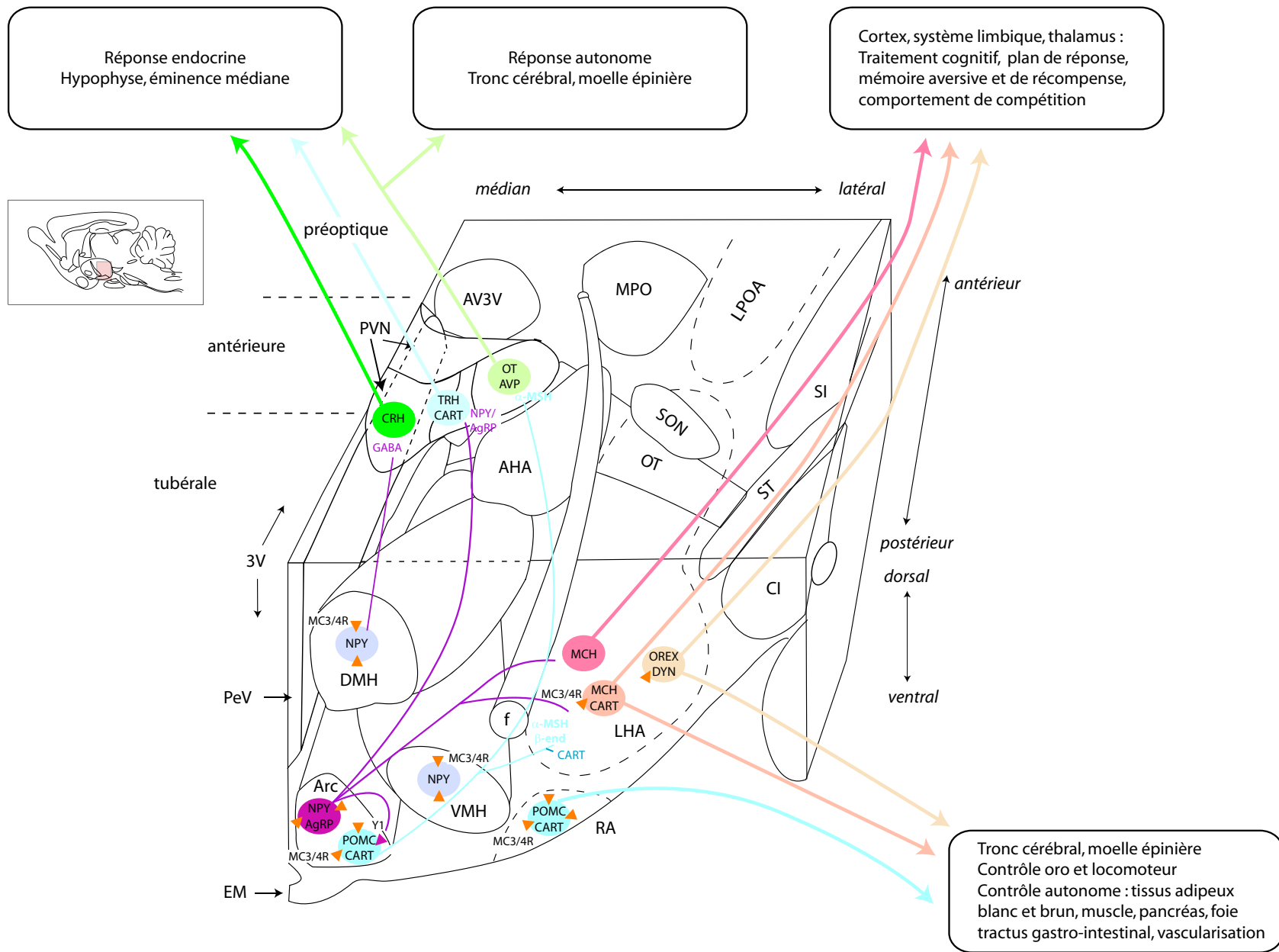


Figure 11 : Représentation des neurones et de leurs projections participant au contrôle de la prise alimentaire et de la balance énergétique au niveau de l'hypothalamus (Adapté de Berthoud, 2002).

Les neurones du noyau arqué, des noyaux ventromédian et dorsomédian, de l'aire retrochiasmatic, possèdent la forme longue du récepteur de la leptine (ObRb, triangles oranges). Les neurones de l'arcué, contenant l'ARN-m du Neuropeptide Y (NPY) et du peptide apparenté à la protéine Agouti (AgRP) projettent vers le noyau paraventriculaire (PVN) et l'hypothalamus latéral. Une population différente de neurones de l'arcué et de l'aire retrochiasmatic, contenant des ARN-m de la POMC et du CART projettent vers l'hypothalamus latéral, et vers les aires autonomes et motrices du tronc cérébral et de la moelle épinière, vers le PVN, le DMN, et d'autres aires cérébrales (non représentées). Dans l'hypothalamus latéral (LHA), un groupe de neurones recevant des projections de l'arcué contient de la MCH, un autre contient MCH et CART, et un autre l'orexine A (OREX) et la dynorphine (DYN). Ces neurones envoient des projections ascendantes (cortex, amygdale, hippocampe, thalamus) et descendantes vers les aires oromotrices (noyaux médulaires moteur), locomotrices (aire pedunculomotrice et moelle épinière) et vers les aires premotrice et motrice autonomes (noyau dorsal moteur du vague, A5, RVLM et ILM).

I. Systèmes hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire (figure 11)

I-1. Localisation anatomique du contrôle de la prise alimentaire

Il y a plus de 60 ans, des expériences de lésions et de stimulations électriques de régions spécifiques de l'hypothalamus avaient conduit à identifier un centre de la faim : l'aire hypothalamique latérale (AHL) et un centre de la satiété : le noyau ventro médian (VMH) (Stellar, 1994). Petit à petit, la mise en évidence de populations neuronales régularisées par des signaux spécifiques de l'état nutritionnel et capables de réguler la prise alimentaire et la dépense énergétique a fait évoluer cette organisation du contrôle de la prise alimentaire en centres vers une organisation en circuits neuronaux exprimant des neuropeptides orexigènes et anorexigènes. Ces circuits sont composés de neurones qui vont recevoir directement l'information de la périphérie (neurones de premier ordre) et la transmettre à d'autres neurones non en relation directe avec la périphérie (neurones de second ordre) qui vont intégrer cette information.

I-1-a. Les neurones de premier ordre

Ces neurones sont localisés dans le noyau arqué qui joue, de par sa position, un rôle fondamental dans le contrôle de la prise alimentaire. Proche du troisième ventricule et de l'éminence médiane il est accessible aux facteurs périphériques qui n'ont pas la possibilité de traverser la barrière hémato-encéphalique. De plus c'est la seule partie de l'hypothalamus avec le NPV qui exprime la synthase des acides gras (Kim *et al.*, 2002). Il est donc capable de répondre aux métabolites intermédiaires du métabolisme des acides gras.

Le noyau arqué contient

- des neurones qui expriment des peptides orexigènes : le neuropeptide Y (NPY) et le peptide apparenté à la protéine agouti (AgRP) (Broberger *et al.*, 1998; Hahn *et al.*, 1998).
- des neurones qui expriment des peptides anorexigènes : la pro-opiomélanocortine (POMC) et le transcrite régulé par la cocaïne et l'amphétamine (CART) (Elias *et al.*, 1998; Kristensen *et al.*, 1998)

I-1-b. Les neurones de second ordre

Les neurones orexigènes et anorexigènes de l'ARC projettent vers

- le noyau paraventriculaire à proximité des neurones à corticolibérine (CRH) et thyroliibérine (TRH), 2 peptides anorexigènes.

- l'aire hypothalamique latérale à proximité des neurones à hormone de concentration de la mélanine (Melanin Concentrating Hormone, MCH), peptide orexigène
- l'aire périfornicale à proximité des neurones à orexine, peptide orexigène.

I-2. Populations neuronales orexigènes

I-2-a. Les neurones à NPY

Le NPY est, à ce jour, le plus puissant neuropeptide orexigène. Il est fortement exprimé au niveau du noyau ARC dans des neurones qui projettent sur les neurones ipsilatéraux du noyau paraventriculaire (NPV)(Bai *et al.*, 1985) qui constitue un site majeur d'intégration des informations liées à l'homéostasie énergétique. Son niveau d'expression reflète l'état nutritionnel, il est maximal après restriction alimentaire et il retourne à des valeurs basales après renutrition (Chua *et al.*, 1991; Davies et Marks, 1994)

L'administration aigue de NPY au niveau central et en particulier dans le NPV et l'aire périfornicale stimule la prise alimentaire (Levine et Morley, 1984; Stanley *et al.*, 1986) et des injections répétées de NPY dans le NPV déclenche un phénomène d'hyperphagie qui aboutit à l'obésité (Currie et Coscina, 1995; Stanley *et al.*, 1989). Néanmoins, les souris invalidées pour le gène du NPY ont un poids et une composition corporelle identiques à ceux des souris contrôles suggérant une redondance des différents systèmes (Erickson *et al.*, 1996)

Le NPY se fixe à des récepteurs à sept domaines transmembranaires qui sont au nombre de six Y₁-Y₆ (Spinazzi *et al.*, 2005). L'action du NPY sur la prise alimentaire passerait majoritairement par les sous types 1 et 5 présents au niveau hypothalamique. En effet la prise alimentaire est diminuée chez des animaux traités par un antagoniste du NPY Y1 (Kanatani *et al.*, 1998) ou du NPY Y5 (Daniels *et al.*, 2002) et chez des animaux déficients en NPY Y1 (Pedrazzini *et al.*, 1998) ou NPY Y5 (Marsh *et al.*, 1998). Néanmoins un rôle de NPY Y2 et NPY Y4 ne peut être exclu puisque des souris porteuses d'une délétion du NPY Y2 ou du NPY Y4 restreinte à l'hypothalamus ont un poids inférieur à celui des souris contrôles (Sainsbury *et al.*, 2002; Sainsbury *et al.*, 2002).

I-2-b. Les neurones à AgRP

Le peptide apparenté à la protéine Agouti (AgRP) est colocalisé à 90% dans les neurones à NPY de l'ARC (Hahn *et al.*, 1998). Comme le NPY c'est un orexigène puissant lorsqu'il est administré au niveau central (Rossi *et al.*, 1998). Par ailleurs les souris qui

surexpriment l' AgRP sont hyperphagiques et obèses suggérant un rôle du peptide endogène dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Graham *et al.*, 1997).

L'AgRP est un antagoniste endogène, sélectif des récepteurs MC3R et MC4R. Le fragment C terminal (AgRP 83-132) est capable de bloquer les effets produits par l'administration icv de mélanocortine (Quillan *et al.*, 1998).

I-2-c. Les neurones à MCH

La MCH est un composé cyclique qui comporte 19 aa. Chez le rat les neurones à MCH sont localisés principalement dans l'hypothalamus latéral, la zona incerta et l'aire périfornicale (Zamir *et al.*, 1986). L'expression de la MCH est augmentée lors du jeûne (Qu *et al.*, 1996).

L'administration aigue et chronique de MCH stimule la prise alimentaire (Della-Zuana *et al.*, 2002). Par ailleurs, chez la souris, en fonction du fond génétique de départ (C57Bl6 ou SV129) la délétion du gène de la MCH entraîne ou non une augmentation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique ainsi qu'une diminution de la prise de poids (Kokkotou *et al.*, 2005).

Il existe deux récepteurs de la MCH, MCH-R1 et R2, mais il semble que seul le MCH-R1 soit fonctionnel chez le rongeur. Ce sous type est exprimé au niveau du SNC, et notamment au niveau de structures impliquées dans le comportement alimentaire comme le noyau ventromédian et le noyau arqué (Saito *et al.*, 2001). L'effet de MCH sur la prise alimentaire est relayé par le récepteur MCH-R1 puisque cet effet est bloqué par un antagoniste des récepteurs MCH-R1.

I-2-d. Les neurones à orexine/hypocretine

L'orexine existe sous deux formes, Orexine A et B, peptides de respectivement 33 et 28 aa dérivés d'un même précurseur, la prepro-orexine. Les neurones à orexine sont localisés dans l'hypothalamus latéral et postérieur et dans l'aire périfornicale. Ces neurones innervent un certain nombre de noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation du comportement alimentaire notamment l'ARC, le NPV, le DMH, le VMH et le noyau du tractus solitaire (NTS) (Ciriello *et al.*, 2003; Nambu *et al.*, 1999).

Orexine A et B agissent par l'intermédiaire de deux récepteurs OX1 et OX2. L'orexine A a une affinité 10 fois plus importante pour le récepteur OX1 que pour le récepteur OX2, alors que orexine A et B ont la même affinité pour le récepteur OX2.

Une administration aigue d'orexine A et B augmente transitoirement la prise alimentaire (Sakurai *et al.*, 1998) et un traitement chronique de 7 jours entraîne une

augmentation de la prise alimentaire durant la phase diurne chez le rat mais qui est compensée par une diminution de la prise de nourriture durant la phase nocturne et n'entraîne pas de modification des stocks de matière grasse (Yamanaka *et al.*, 1999). Le peptide endogène joue probablement un rôle dans la régulation du comportement alimentaire vraisemblablement à court terme puisque l'administration d'anticorps dirigés contre l'orexine A, ou d'antagoniste des récepteurs OX1, entraîne une diminution de la prise alimentaire chez des rats jeuners (Haynes *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2000).

Etant donné que le système à orexine est impliqué dans le rythme veille/sommeil, il ne peut être exclu que la modulation de prise alimentaire par les orexines soit un effet secondaire et qu'il reflète les besoins nutritionnels associés aux périodes d'éveil (.

I-3. Populations neuronales anorexigènes

I-3-a. Les neurones à POMC : système mélanocortine

La pro-opiomélanocortine (POMC), exprimée dans la partie latérale de l'ARC, est capable, comme nous l'avons vu précédemment, de générer après clivage plusieurs peptides notamment les mélanotropines α MSH et γ MSH (Melanocyte Stimulating Hormones) et les endorphines.

L' α MSH joue un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Elle agit par l'intermédiaire des récepteurs des mélanocortines (MC-R) de type 3 et 4 présents au niveau des noyaux hypothalamiques (ARC, VMH et NPV) (Harrold *et al.*, 1999; Mountjoy *et al.*, 1994) et son administration centrale inhibe la prise alimentaire (Poggioli *et al.*, 1986).

Des mutations du gène de la POMC et du récepteur MC4R entraînent une obésité aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Chez l'homme, une mutation du gène de la POMC entraîne une forme d'obésité précoce qui est associée à une déficience surrénalienne et à une pigmentation rouge des cheveux (Krude *et al.*, 1998) et celle du récepteur MC4R est impliquée dans 1-6% des cas d'obésité sévère observée très tôt au cours de la vie (Yeo *et al.*, 1998). Chez la souris male la perte d'une seule copie du gène de la POMC est suffisante pour favoriser le développement de l'obésité (Smart *et al.*, 2006) et la mutation du récepteur MC4R, induit hyperphagie et obésité (Huszar *et al.*, 1997).

I-3-b. Les neurones à CART (Cocaïne Amphétamine Regulated Transcript)

Le CART a été isolé à partir du cerveau de rat (Douglass et Daoud, 1996) Il est exprimé au niveau du noyau arqué mais aussi du noyau paraventriculaire, du dorsomédian et

de l'aire hypothalamique latérale. Il est coexprimé avec la POMC dans l'ARC, avec la TRH dans le PVN et avec la MCH dans l'hypothalamus latéral (Broberger, 1999; Elias *et al.*, 1998).

Le CART existe sous différentes formes. Les fragments 1-102 et 82-103 sont capables d'inhiber la prise alimentaire spontanée ou induite par des injections de NPY (Kristensen *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 1998) alors que le fragment 55-102 a des propriétés orexigènes lorsqu'il est injecté dans les noyaux ARC et VMH (Abbott *et al.*, 2001) suggérant l'existence de différentes populations neuronales à CART.

Les souris déficientes en CART augmentent leur prise alimentaire, leur poids et leur masse grasse lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en lipides (Asnicar *et al.*, 2001) et l'immunisation passive avec un anticorps anti CART stimule la prise alimentaire (Kristensen *et al.*, 1998) indiquant que le peptide endogène jouerait un rôle anorexigène dans la régulation de la prise alimentaire.

I-3-c. Les neurones à corticolibérine (CRH)

Au niveau hypothalamique, la CRH est exprimée dans le noyau paraventriculaire (Merchenthaler *et al.*, 1982) et cette expression est diminuée après un jeûne chez le rat (Hwang et Guntz, 1997).

Injectée en ICV la CRH diminue la prise alimentaire et le poids et augmente la dépense énergétique (Heinrichs et Richard, 1999).

Il existe deux récepteurs de la CRH, le CRH-R1 et le CRH-R2. Les effets de la CRH sur la prise alimentaire pourraient impliquer les 2 bien qu'aucune donnée claire ne permette de l'affirmer. En effet l'effet de la CRH est diminué après traitement par un antisens dirigé contre le récepteur CRH-R2 (Smagin *et al.*, 1998) mais la souris invalidée pour ce même récepteur ne présente pas de modification de la prise alimentaire basale, seule la prise alimentaire qui fait suite à une période de dénutrition est diminuée (Bale *et al.*, 2000). Chez les souris invalidées pour CRH-R1 ou pour CRH-R1 et CRH-R2 la consommation de nourriture est inchangée (Muller *et al.*, 2000; Preil *et al.*, 2001).

II. Signaux périphériques contrôlant la prise alimentaire

Les mécanismes responsables de la prise alimentaire mettent en jeu des régulations à court et à long terme.

- La régulation à court terme est liée directement à la prise alimentaire et ne dépend pas de la masse adipeuse. Elle fait intervenir des informations sensorielles, neurales et humorales qui sont générées pendant la prise alimentaire, la digestion et la

métabolisation des nutriments. Ces signaux vont avoir une durée de vie qui correspond à l'intervalle interprandial. Ils vont être capables de modifier le volume, la durée de la prise alimentaire, la durée de la période de satiété et également les phénomènes de rassasiement qui auront lieu lors de la prise alimentaire suivante.

- La régulation à long terme : Cette régulation dépend essentiellement de facteurs de nature hormonale, dont l'intensité est fonction de l'adiposité. L'action de ces signaux est retardée par rapport à la prise alimentaire. Ils agissent en modifiant l'impact des signaux à court terme sur les régions cérébrales qui contrôlent la prise alimentaire. Ils ont également une action directe sur les zones hypothalamiques contrôlant l'équilibre énergétique.

II-1. La régulation à court terme

La prise alimentaire est régulée à court terme par les macronutriments ingérés (glucose, acides aminés, acides gras) et par les hormones gastro-intestinales générées au cours du repas.

II-1-a. Les macronutriments

Le glucose est capable d'influencer le taux de décharge de neurones hypothalamiques spécifiques. L'oxydation du glucose dans ces neurones génère de l'adénosine tri-phosphate (ATP), qui va contrôler l'activité d'un canal potassium sensible à l'ATP présent sur la membrane. La fermeture de ce canal en réponse à des concentrations croissantes d'ATP (par rapport à l'adénosine di-phosphate) entraîne une augmentation du potassium intracellulaire, ce qui dépolarise la cellule et augmente la fréquence de décharge de ces neurones et peut donc ainsi participer à l'initiation ou la fin des repas (Ashford *et al.*, 1990). Chez le rat et chez l'homme, la glycémie baisse de 10 à 12% avant les épisodes de prise alimentaire et réaugmente après.

L'apport protéique et lipidique pourrait aussi induire la satiété à court terme puisqu'il a été montré que l'administration d'acides aminés ou de lipides inhibait la prise alimentaire (Cota *et al.*, 2006; Obici *et al.*, 2002).

II-1-b. Peptides gastrointestinaux.

Le contact des aliments avec le tube digestif entraîne la sécrétion d'un certain nombre de peptides qui vont agir au niveau de l'hypothalamus soit directement (PYY, OXM)

soit indirectement via les fibres vagues et le noyau du tractus solitaire (CCK, GLP-1). Dans ce dernier cas des projections du noyau du tractus solitaire, directes ou relayées par le noyau parabrachial vont innerver les noyaux hypothalamiques comme le noyau paraventriculaire, le noyau dorso-médian, le noyau arqué, et l'aire hypothalamique latérale.

- La cholecystokinine (CCK) :

La CCK est sécrétée par le tractus gastro-intestinal. Il existe plusieurs formes bioactives, CCK-58, CCK-33 et CCK-8, qui dérivent toutes du même précurseur mais seul le composé sulfaté intervient dans la régulation de la prise alimentaire. La CCK est rapidement libérée dans la circulation en réponse aux nutriments et elle reste élevée durant plus de 5h. Elle coordonne la digestion en stimulant la libération des enzymes du pancréas et de la vésicule biliaire, en augmentant la motilité gastrique et en inhibant la vidange gastrique.

L'injection de CCK chez l'animal et l'homme réduit la prise alimentaire, en diminuant à la fois la taille et la durée des repas. La CCK exerce ses effets par l'intermédiaire de deux récepteurs appartenant à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires, le récepteur CCK_A et le récepteur CCK_B. Le récepteur CCK_A est présent au niveau du cerveau et plus particulièrement dans des aires telles le NTS, l'hypothalamus dorsomédian et l'area postrema. Au niveau périphérique, on le retrouve dans le pancréas, dans les afférences vagues et dans les neurones entériques. Le récepteur CCK_B est également largement distribué dans le cerveau, il est présent au niveau du nerf vague et dans l'estomac. La forme sulfatée a une affinité plus grande pour le récepteur CCK_A et l'administration d'un antagoniste pour ce récepteur augmente la prise calorique et réduit la satiété.

- Le peptide YY (PYY) :

Le PYY est sécrété majoritairement par la partie distale du tractus gastro-intestinal et proportionnellement à la quantité de calories ingérées pendant un repas. Il augmente rapidement après les repas, atteint un plateau après une à deux heures et reste élevé pendant une période de 6h (Adrian *et al.*, 1985). Les niveaux de PYY sont aussi influencés par la composition des repas (des niveaux plus importants sont observés en présence d'un repas riche en graisses (Lin et Taylor, 2004) et par l'acide gastrique, la CCK, les sels biliaires, les IGF-1, la bombésine, le peptide apparenté à la calcitonine et le peptide ressemblant au glucagon de type 1.

Le PYY circule majoritairement sous deux formes, PYY₁₋₃₆ et PPY₃₋₃₆. La forme active que l'on trouve à la périphérie, est le PPY₃₋₃₆. Il a des propriétés anorexigènes, il retarde la vidange gastrique, les sécrétions pancréatiques et stomacales. Il favorise l'absorption des fluides et des électrolytes. Chez le rongeur et chez l'homme des injections périphériques de PYY sont capables de diminuer la prise alimentaire (Batterham *et al.*, 2003; Batterham *et al.*, 2002). Cet effet persiste 12 heures après l'arrêt de l'administration du peptide.

Le PYY se fixe à tous les récepteurs Y₁ à Y₅ alors que le PYY₃₋₃₆ se fixe préférentiellement au récepteur Y₂ et dans une moindre mesure aux récepteurs Y₁ et Y₅ (Larhammar, 1996). La partie N-terminale du PYY lui permet de traverser la BHE. Les effets du PYY₃₋₃₆ passeraient par l'inhibition des récepteurs présynaptiques Y₂ portés par les neurones à NPY du noyau ARC. En effet des études électrophysiologiques ont montré que le PYY₃₋₃₆ était capable d'inhiber les neurones NPY, et que l'administration périphérique de PYY₃₋₃₆ réduisait le contenu en ARN-m du NPY (Batterham *et al.*, 2002; Challis *et al.*, 2003). De plus les effets anorexigènes du PYY₃₋₃₆ sont abolis chez les souris invalidées pour le récepteur Y₂ et réduits par des antagonistes de ce récepteur (Abbott *et al.*, 2005; Batterham *et al.*, 2002). L'inhibition des neurones NPY est accompagnée d'une augmentation modérée de l'activité des neurones à POMC qui contribuent à réduire la prise alimentaire Enfin le PYY est toujours capable d'induire la prise alimentaire chez les souris déficientes pour le récepteur MC4R (Halatchev *et al.*, 2004), ce qui semble indiquer que l'action de ce peptide est indépendant de ce récepteur.

- Peptide de la famille du glucagon 1 (GLP1) :

Le gène du proglucagon est exprimé dans l'intestin, le pancréas et le NTS. Les enzymes prohormone convertases 1 et 2 vont cliver le proglucagon en différents produits en fonction des tissus. Les formes majoritaires sont le glucagon au niveau du pancréas et l'oxyntomoduline (OXM) et les peptides ressemblant au glucagon de type 1 et 2 (GLP) dans le cerveau et l'intestin (Bataille *et al.*, 1988; Blache *et al.*, 1988; Larsen *et al.*, 2003; Mojsov *et al.*, 1986).

Chez le rongeur, l'administration de GLP-1 dans le 4^{ème} ventricule et dans le NPV diminue les calories consommées (McMahon et Wellman, 1997; Turton *et al.*, 1996). Chez l'homme, l'injection d'OXM diminue la sensation de faim et la prise calorique de 19%, cet effet dure pendant les 12 heures qui suivent l'injection.

Les récepteurs du GLP-1 sont présents au niveau du NTS et de l'hypothalamus. Ils sont également présents à la périphérie (pancréas, poumon, cerveau, rein, tractus gastro-intestinal et cœur). Les effets du GLP-1 et de l'OXM sur l'homéostasie énergétique semblent dépendre de ce récepteur puisque l'antagoniste exendine (9-39) bloque leurs effets quand il est administré au niveau central.

II-2. La régulation à long terme

Cette régulation permet d'adapter la prise alimentaire en fonction des stocks énergétiques déjà disponibles dans l'organisme. Dès les années 1950 des expériences de parabiose (technique chirurgicale qui consiste à mettre en contact le tissu sous cutané de deux animaux permettant ainsi la diffusion de facteurs humoraux d'un animal à l'autre) avaient permis de mettre en évidence la nature hormonale de cette régulation (Hervey, 1959). En effet lorsque cette expérience est réalisée avec un rat rendu obèse par lésion du noyau ventromédian et un rat normal, le rat normal développe une anorexie et perd du poids suggérant qu'un signal hormonal est généré par l'excès d'adiposité du rat rendu obèse, ce dernier étant insensible à ce signal probablement à cause de la lésion hypothalamique. Cette expérience a été reprise dix ans plus tard avec des souris génétiquement obèses par mutation autosomique récessive au niveau du locus du gène ob. Le croisement de ces souris avec des souris normales leur fait diminuer leur prise alimentaire et leur prise de poids ce qui a conduit Coleman et collaborateurs à en déduire que l'obésité de ces souris était la conséquence d'un défaut de production d'un signal hormonal qui supprimait la prise alimentaire (Coleman, 1973).

Ces hormones qui informent l'organisme sur le niveau d'adiposité vont soit inhiber les voies orexigéniques soit activer les voies anorexigènes

II-2-a. L'insuline

L'insuline est une hormone métabolique majeure, elle a été décrite comme le premier signal d'adiposité (Schwartz *et al.*, 1992). Sa sécrétion par les cellules bêta du pancréas est stimulée par les nutriments (glucose, acides aminés) et les hormones dépendantes du glucose GIP (glucose dependent insulintropic polypeptide) et GLP1 (glucagon like peptide 1) qui sont libérées au cours du repas ou en réponse à l'activation du système parasympathique innervant le pancréas (D'Alessio *et al.*, 2001). Les niveaux en insuline varient en fonction de l'adiposité (Chlouverakis et White, 1969).

L'insuline est transportée à travers la barrière hématoencéphalique et sa concentration dans le liquide céphalorachidien est proportionnelle à celle dans le sang (Schwartz *et al.*, 1990). Les récepteurs à l'insuline sont présents au niveau hypothalamique notamment dans l'ARC (Baskin *et al.*, 1988).

L'injection chronique d'insuline pendant plusieurs semaines entraîne une diminution de la masse corporelle (Woods *et al.*, 1979). L'insuline semble agir en modulant les niveaux en NPY et en POMC, puisque chez le rat elle est capable de bloquer l'augmentation de NPY observée après une période de jeûne, et d'augmenter l'expression de POMC dans les mêmes conditions (Benoit *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 1991). De plus la réduction de prise alimentaire observée après injection d'insuline peut être bloquée par des antagonistes de la POMC (Benoit *et al.*, 2002). Chez le rat diabétique l'expression de la POMC diminuée de 80% est augmentée après injection d'insuline et l'hyperphagie est diminuée de 50% (Sipols *et al.*, 1995).

II-2-b. La leptine

La leptine est une hormone peptidique, produit du gène *ob*, sécrétée majoritairement par le tissu adipeux (Zhang *et al.*, 1994), et à un moindre niveau par l'épithélium digestif (Bado *et al.*, 1998) et le placenta (Masuzaki *et al.*, 1997). La production de leptine corrèle positivement avec la masse de tissu adipeux (Zhang *et al.*, 1994).

La leptine joue un rôle majeur dans la régulation centrale de l'homéostasie énergétique. Une mutation du gène *ob*, responsable de l'absence de leptine circulante, induit un phénotype hyperphagique chez la souris (souris *ob/ob*) ; l'administration de leptine exogène est capable de contrecarrer ce phénotype (Huszar *et al.*, 1997). Des mutations comparables existent chez l'homme et se traduisent par une obésité sévère (Montague *et al.*, 1997) qui peut être améliorée aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte par des injections de leptine recombinante (Yeo *et al.*, 1998; Yildiz *et al.*, 2004).

Le récepteur de la leptine fait partie de la famille des récepteurs des cytokines, il possède un seul domaine transmembranaire (White et Tartaglia, 1996). Chez l'homme et la souris il existe 5 sous types issus d'un épissage alternatif (1 forme longue et 4 courtes) Chez le rat une 6^{ème} forme courte a été clonée (Wang *et al.*, 1996). La forme majoritaire est la forme courte, elle est exprimée en périphérie mais également au niveau des plexus choroïdes où elle pourrait jouer le rôle de transporteur (Kastin *et al.*, 1999). La forme longue qui possède un domaine intracytoplasmique est exprimée en majorité dans l'hypothalamus notamment par les

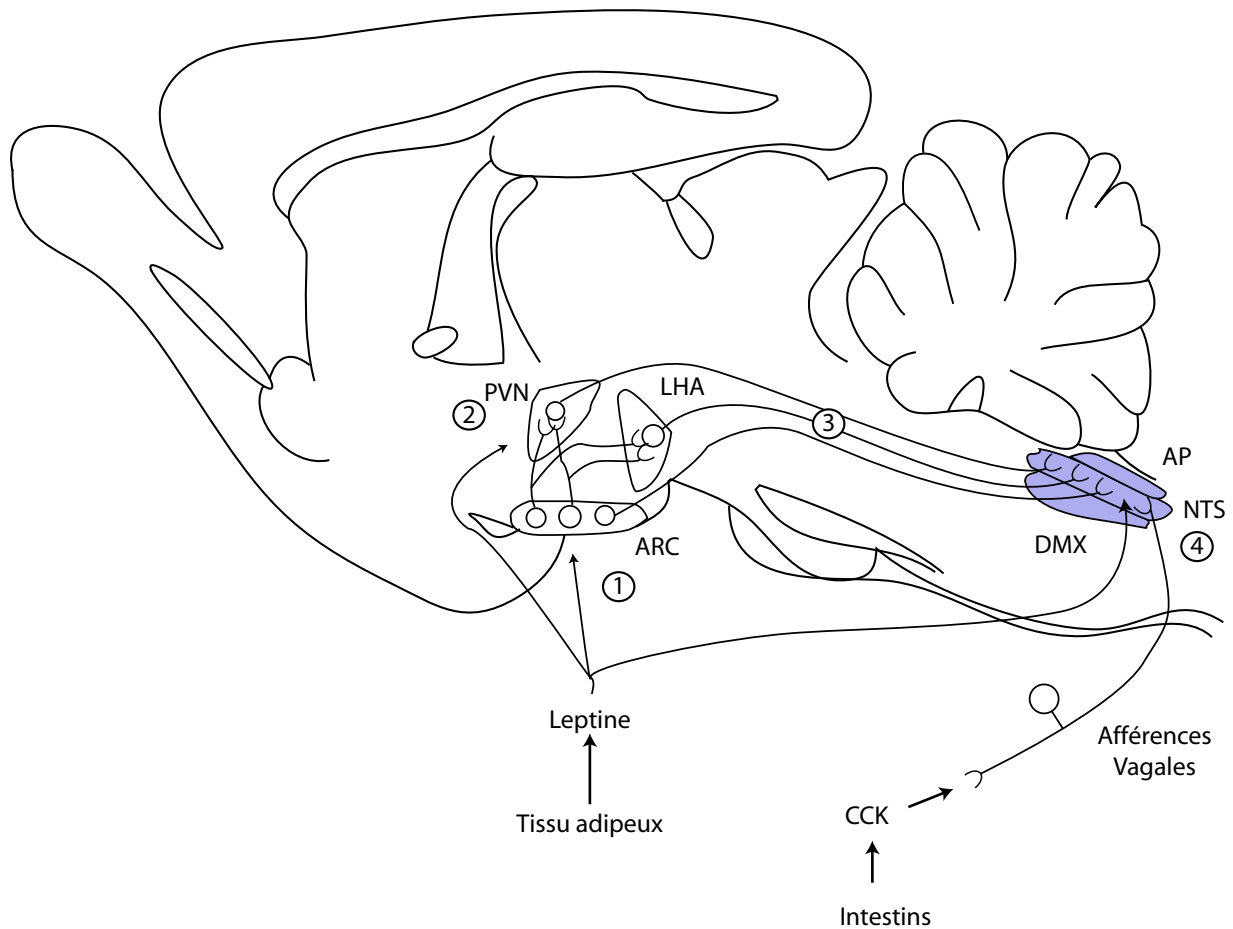


Figure 12 : Modèle d'intégration des signaux d'adiposité et de satiété (D'après Morton, 2006).

Les afférences qui informent de la proportion corporelle en masse grasse (par exemple, la leptine) augmentent le pouvoir de satiété de signaux comme la CCK, qui sont générés en réponse à la consommation d'aliments et qui vont permettre la fin des repas. L'hypothalamus joue un rôle clé dans l'action de la leptine, l'effet de la CCK passe par une activation des fibres vagales qui projettent au niveau du NTS. L'intégration de ces signaux implique une action de la leptine au niveau de l'ARC (1) ou d'autres aires hypothalamiques (2). Ces neurones projettent vers le NTS (3) et influencent la réponse à la CCK (4). La leptine peut agir directement au niveau du NTS

AP, area postrema; DMX, noyau dorsal moteur du nerf vague; LHA, aire hypothalamique latérale; NTS, noyau du tractus solitaire; PVN, noyau paraventriculaire.

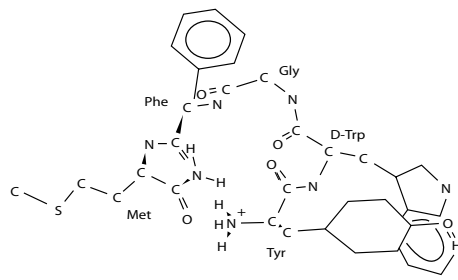
neurones du noyau arqué mais également dans une moindre mesure par ceux du noyau paraventriculaire et de l'AHL. Ce récepteur est couplé à la voie JAK/STAT 3. L'administration de leptine active la translocation de STAT3, la phosphorylation de la phosphatidylinositol-3-OH kinase et l'expression de plusieurs gènes parmi lesquels SOCS-3 et c-fos. Chez la souris db/db, la mutation de cette forme longue conduit à un phénotype obèse (Chen *et al.*, 1996). Des mutations comparables ont été retrouvées chez l'homme, elles donnent lieu à une obésité précoce (Clement *et al.*, 1998).

L'administration icv de leptine diminue la prise alimentaire et la prise de poids (Seeley *et al.*, 1996). Cet effet est, au moins en partie, du à l'inhibition des neurones NPY/AgRP et l'activation des neurones POMC/CART. Les récepteurs à leptine sont présents au niveau des neurones à NPY/AgRP (Mercer *et al.*, 1996) et au niveau des neurones à POMC/CART (Cheung *et al.*, 1997). Les neurones orexigènes à NPY/AgRP sont inhibés par la leptine et activés dans des conditions où la leptine est basse (Stephens *et al.*, 1995). Inversement la leptine active les neurones anorexigènes à POMC/CART (Schwartz *et al.*, 1997) et les souris délétées pour le récepteur de la leptine au niveau des neurones à POMC sont obèses et hyperleptinémiques (Balthasar *et al.*, 2004). Par ailleurs l'effet anorexigène de la leptine est atténué en présence d'antagoniste des récepteurs MC4R, (Seeley *et al.*, 1997).

Des injections de leptine au niveau du 4^{ème} ventricule induisent une réduction de la prise alimentaire et du gain de masse corporelle (Grill *et al.*, 2002) ce qui indique que la leptine agit aussi au niveau du NTS. D'ailleurs ce noyau exprime le récepteur Ob-Rb (Mercer *et al.*, 1998).

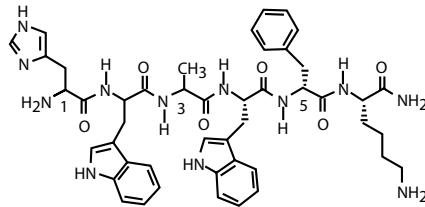
En conclusion le contrôle central de l'homéostasie énergétique impliquent deux populations neuronales hypothalamiques majeures : une population orexigène composée de neurones NPY et AgRP et une population anorexigène composée de neurones POMC et CART. Ces neurones intègrent d'une part des signaux de satiété ce qui permet la fin des repas et d'autre part des signaux d'adiposité ce qui permet de réguler le stock de tissu adipeux (figure 12). Lors d'un déficit énergétique la voie anabolique impliquant les neurones à NPY-AgRP est activée alors que la voie catabolique impliquant les neurones POMC-CART est inhibée et inversement lorsque le stock de graisse est trop important.

L'activité de ces neurones peut aussi être contrôlée par d'autres facteurs périphériques comme la ghreline comme nous le verrons plus loin.



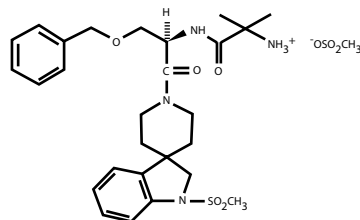
Bowers et al, 1978

D Trp-met-Enk



Bowers et al, 1984

GHRP6



Smith et al, 1993

MK-0677

Figure 13 : Structure de 3 secrétagogues de l'hormone de croissance peptidiques (D-Trp Met enk, GHRP6) et non peptidique (MK-0677).

C) LES GH SECRETAGOGUES (GHS)

L'histoire des GHS est un bel exemple de pharmacologie inverse, avec la découverte de substances synthétiques capables de stimuler la sécrétion de GH en activant un récepteur non identifié, puis le clonage de ce récepteur, et enfin le clonage du ligand endogène de ce récepteur.

Dans ce chapitre ne seront présentées que les données concernant les différentes étapes ayant conduit à la découverte d'un GH sécrétagogue endogène, la ghreline, ainsi que les effets observés après administration de cette dernière. L'objectif de notre travail ayant été de définir le rôle de la ghreline endogène, les données de la littérature relatives à cette fonction sont citées dans les différentes discussions de nos propres résultats.

I. Les GHS de synthèse : du GHRP6 au MK-0677 (figure 13)

L'histoire des GH sécrétagogues débute à la fin des années 70 lorsque Bowers et al à la recherche d'analogues opiacés capables d'antagoniser l'activité GnRH à des doses physiologiques modifient la structure de la met-enkephaline et synthétisent la D-Trp2-met-enkephaline (Bowers *et al.*, 1977). Cette dernière ne présente plus d'activité opiacée, mais est capable de stimuler la sécrétion de GH in vitro (Bowers *et al.*, 1980). Cette synthèse est suivie par celle d'un hexapeptide, l'His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂, qui lui stimule la sécrétion de GH à la fois in vitro et in vivo (Bowers *et al.*, 1984). Cet hexapeptide est nommé GH Releasing Peptide 6 (GHRP-6) et est le premier d'une grande famille : les GH sécrétagogues (GHS). Ces GHS présentent très vite un intérêt pour l'industrie pharmaceutique qui y voit des débouchés thérapeutiques. Les GHS apparaissent en effet comme de bons candidats pour pallier au déclin de GH observé au cours du vieillissement (Van Cauter *et al.*, 1996).

Les premiers GHS, comme le GHRP6, ne présentent pas une très bonne biodisponibilité (seulement 0,3% après administration orale) et leur demie vie est très courte (moins de 20 minutes). Des modifications de la structure du GHRP-6 vont être réalisées afin d'améliorer ces caractéristiques et des dérivés peptidiques, puis non peptidiques vont être synthétisés (Smith, 2005). (figure 13). La biodisponibilité après administration orale chez le Chien de l'un de ces dérivés non peptidiques, le MK-0677, sera de plus de 60%, et sa demie vie d'environ 4,7 heures.

II. Du récepteur des GHS, le GHSR1a, à son ligand endogène la ghreline

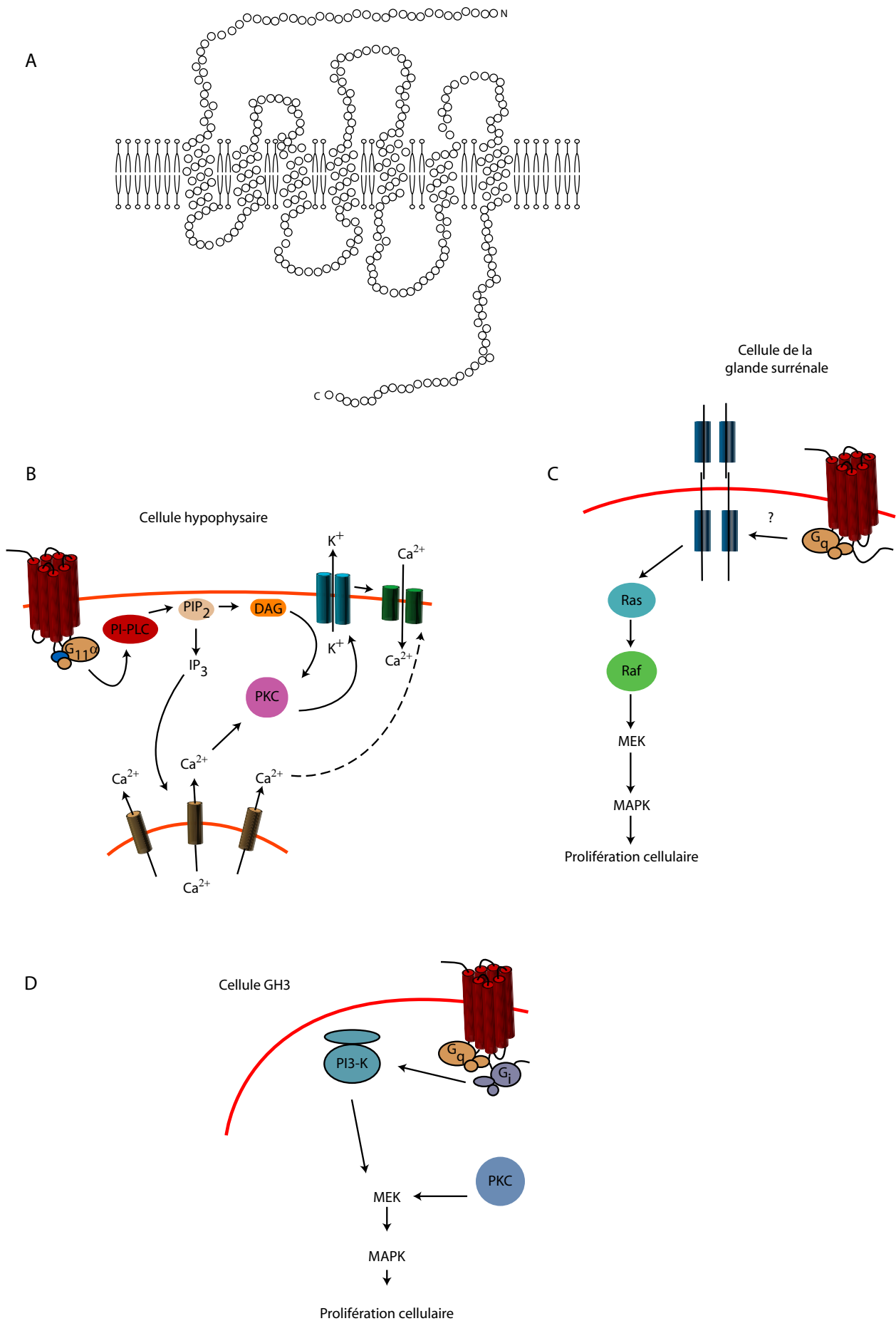


Figure 14 : Le récepteur GHS-R 1a et ses voies de signalisation

A- Le récepteur des GH sécrétagogues de type Ia a été purifié et cloné par Howard et al. (1996) à partir d'hypophyses de porc. Son ADNc code pour une protéine de 366 acides aminés. Il présente toutes les caractéristiques des récepteurs à 7 domaines transmembranaires.

B- Au niveau de la cellule hypophysaire, la ghreline active la phosphatidylinositol phospholipase C et génère de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et du diacylglycerol (DAG) à partir de phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP₂). Il y a ensuite une libération de calcium (Ca²⁺) à partir des stocks sensibles aux IP₃. La PKC inhibe les canaux potassium (K⁺), entraînant la dépolarisation cellulaire et l'ouverture des canaux Ca²⁺ de type L et T. La flèche en pointillé indique une libération alternative de calcium à partir d'un canal Ca²⁺ présent au niveau de la membrane plasmique.

C- Au niveau des cellules de la glande surrénale, l'activation de la MAPK est médiée par la voie Ras-Raf-MEK-MAPK via la transactivation d'un récepteur à tyrosine kinase.

D- Au niveau des cellules GH3 la ghreline active la MAPK via la PI3-K et la PKC par l'intermédiaire d'une protéine G_{i/o}.

II-1. Clonage du récepteur GHSR1a

Plusieurs données montraient que les GHS agissaient par l'intermédiaire d'un récepteur qui était différent du GHRH-R.

Le GHRP6 :

- agit de façon synergique avec la GHRH sur la production de GH et sur l'accumulation d'AMPc (Cheng *et al.*, 1989).
- active la voie de la protéine kinase C et augmente la libération de calcium intracellulaire alors que la GHRH active la voie de la protéine kinase A (Cheng *et al.*, 1991).
- induit une désensibilisation de son récepteur différente de celle induite par la GHRH sur le GHRH-R (Parmar *et al.*, 1999).

La stratégie utilisée pour purifier et cloner le récepteur des GHS est fondée sur l'observation que son activation entraîne une augmentation des concentrations de calcium intracellulaire. Des pools d'ARN polyA+ d'hypophyse de porc ont été co-injectés avec des ARN de l'aéuorine, une sonde bioluminescente sensible au calcium, à des ovocytes de xénope. La détection de la bioluminescence de l'aéuorine après application de MK-0677 a permis d'identifier un seul clone et le séquençage de ce clone a mis en évidence un récepteur orphelin appartenant à la classe des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G : le GHSR1a (Howard *et al.*, 1996) (figure 14A).

Ce récepteur possède 51,6% d'homologie avec le récepteur de la motiline (McKee *et al.*, 1997), 34,9% avec le récepteur de la neurotensine et 29% avec celui de la TRH (Howard *et al.*, 1996). Chez l'homme il est situé sur le chromosome 3 en position q26.2, il comporte 366 acides aminés. Le gène peut donner après épissage alternatif une autre protéine de 289 acides aminés qui ne comporte plus les domaines transmembranaires 6 et 7 : le GHSR1b. Le rôle de cette forme tronquée n'est pas encore défini. Une seule étude rapporte que chez le poisson la co-transfection de quantités croissantes de GHSR1b avec le GHSR1a atténue le signal induit par des agonistes synthétiques tel que le GHRP6 (Chan et Cheng, 2004).

La fixation d'un GHS sur le GHSR1a :

- active la phosphatidylinositol phospholipase C qui génère des inositol tri-phosphates qui libèrent les stocks de calcium intracellulaire et activent la protéine kinase C (PKC). La PKC va inhiber les canaux potassiques et produire une dépolarisation cellulaire et l'ouverture de canaux calciques de type L et T. Cette voie de signalisation est observée sur les cellules de l'hypophyse (Adams *et al.*, 1998; Herrington et Hille, 1994; Howard *et al.*, 1996; McKee *et al.*, 1997) (figure 14B). (Herrington et Hille, 1994)

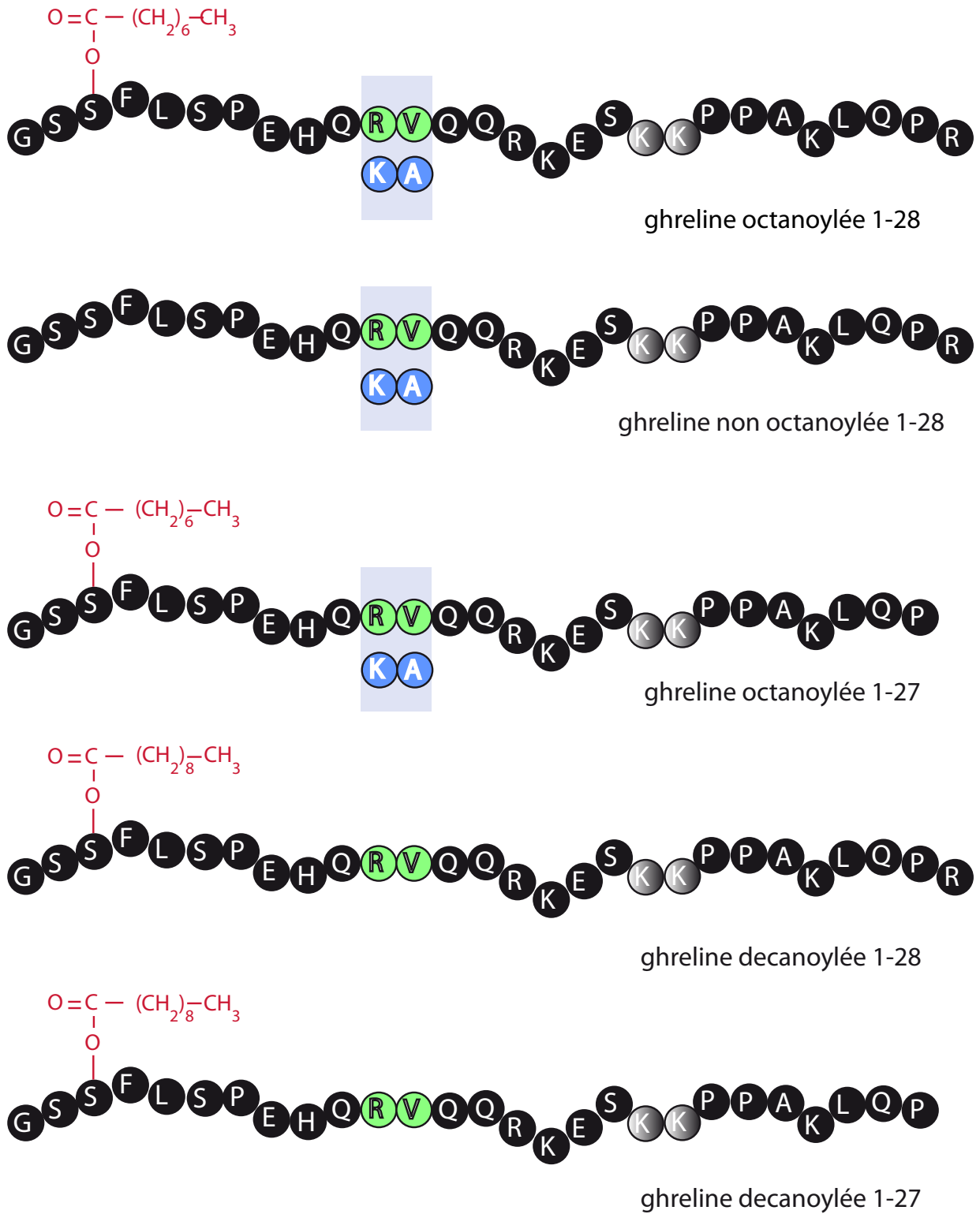


Figure 15 : Les différentes formes de ghreline chez l'homme et chez le rat

Les ghrelines humaines et murines diffèrent par deux acides aminés, représentés en vert pour les formes humaines et en bleu pour les formes murines

- active la voie des protéines kinases associées aux mitochondries (MAPK) soit via les Ras-Raf-MEK MAPK et la transactivation d'un récepteur à tyrosine kinase par les sous unités α et β dans le cas des cellules de la glande surrénale (Spinazzi *et al.*, 2005) (figure 14C) et également via la PI3-K et la PKC dans le cas des cellules GH3 (Nanzer *et al.*, 2004) (figure 14D).

II-2. La ghreline

II-2-a La ghreline et ses différentes formes (figure 15)

La difficulté rencontrée pour cloner le ligand endogène du GHSR1a tient probablement au fait qu'il présente une modification post-traductionnelle particulière qui est essentielle à sa fixation sur le récepteur. En fait durant la même période, deux équipes vont cloner le même gène par des approches différentes :

- Soit en utilisant le récepteur GHSR1a, couplé à un système de mesure du flux calcique qui permet d'évaluer la capacité d'extraits d'organes à augmenter les concentrations en calcium intracellulaire. C'est dans l'estomac que le signal sera le plus fort et que le ligand endogène de ce récepteur sera purifié. Il sera nommé ghreline (racine Proto-Indo-Européenne ghre pour grow et suffixe relin pour « releasing substance »). C'est un peptide de 28 acides aminés dont la serine en position 3 est modifiée par un groupement octanoyl (Kojima *et al.*, 1999).
- Soit en recherchant, chez le rongeur, des peptides ayant une homologie avec la motiline. Le même gène est isolé et nommé MTRLP pour motilin related peptide. La présence d'un doublet basique de lysine, fait faire l'hypothèse que ce pro-peptide pourrait être clivé en un peptide de 18 acides aminés. Néanmoins cette approche ne permet pas de prédire la modification post-traductionnelle (Tomasetto *et al.*, 2000).

Il existe une grande homologie de séquence entre les espèces. Les 7 premiers acides aminés sont identiques chez l'Homme, le rat, la souris, le porc, le chien, le bœuf, et le poulet. Les acides aminés en position 2 et 3 sont différents chez la grenouille et l'acide aminé en position 2 est différent chez le poisson. Cette grande homologie entre les espèces suggère un rôle physiologique important de la ghreline.

La ghreline existe sous différentes formes octanoylées ou non octanoylées ces dernières n'activant pas le GHS-R1a. La modification post-traductionnelle qui conduit à l'octanoylation a probablement lieu, au moins en partie, au niveau de l'estomac dans les cellules produisant la ghreline puisque ces cellules sont reconnues par des anticorps capables de distinguer les deux formes; néanmoins aucune colocalisation n'est démontrée dans cette étude (Date *et al.*, 2000). Par ailleurs il a été suggéré récemment que les acides gras de l'alimentation pourraient être directement incorporés au niveau de la ghreline (Nishi, 2005).

Dans la circulation la ghreline est principalement détectée sous la forme non octanoylée (Akamizu *et al.*, 2005; Hosoda *et al.*, 2000). Néanmoins la forme octanoylée disparaît beaucoup plus rapidement avec une demi-vie de 10-12 min par rapport à 20-30 min pour la forme non octanoylée (Tolle *et al.*, 2002) et elle est aussi facilement déoctanoylée (Hosoda *et al.*, 2004) ce qui pourrait expliquer qu'elle ne représente que 10 à 20% de la ghreline plasmatique totale.

A côté de ces deux formes, des formes minoritaires ont été décrites chez le rat et chez l'homme. Chez le rat, le gène de la ghreline peut donner par épissage alternatif, un peptide, octanoylé ou non, dont la glutamine en position 14 est absente (Hosoda *et al.*, 2000). Chez l'homme l'octanoylation peut être remplacée par une décanoylation voire une décénoylation (Hosoda *et al.*, 2003). Dans les 2 espèces la ghreline peut aussi n'être composée que de 27 acides aminés. En effet il existerait une carboxypeptidase de type B capable d'enlever l'arginine en position 28 (Hosoda *et al.*, 2003).

II-2-b. Caractérisation des sites de liaison de la ghreline sur le GHSR1a.

La ghreline ne présente pas d'homologie avec les GHS de synthèse tels que le GHRP6 et l'hexaréline suggérant que l'activation du GHSR-1a ne nécessite pas une disposition identique des différentes classes d'agonistes au niveau du site de liaison.

Des expériences de mutagenèse dirigée (figure 16) ont permis de montrer que les GHS se positionnent dans une poche de liaison délimitée par les domaines trans-membranaire 3, 5 et 6 en interagissant avec les acides aminés situés dans cette région. Au niveau du domaine transmembranaire 3, la chaîne latérale de l'acide glutamique en position 124 joue un rôle important pour l'activation du récepteur en formant un pont salin avec l'amine du MK-0677, ou l'amine N terminale du GHRP6 (Feighner *et al.*, 1998). Cet acide aminé est également important pour l'activation du récepteur par la ghreline tout comme les résidus Phe279 et Arg283 (Holst *et al.*, 2006). Par ailleurs des expériences *in vitro* montrent que pour

la ghrelina seuls les 4 premiers acides aminés porteurs du groupement octanoyl sont nécessaires (Bednarek *et al.*, 2000).

D'autres ligands, l'adénosine et la cortistatine, se fixent également sur le GHS-R1a sur des sites différents au moins en ce qui concerne l'adénosine (Deghenghi *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2000; Tullin *et al.*, 2000). L'adénosine active le récepteur GHSR1a humain ou porcin transfecté dans des cellules HEK-293, cependant elle ne stimule pas la sécrétion de GH et n'amplifie pas les effets de la GHRH sur la libération de GH à partir de cellules d'hypophyse en culture (Tullin *et al.*, 2000). La cortistatine est quant à elle capable de déplacer la liaison de la [125I]ghrelina sur des membranes d'hypophyse humaine (Muccioli *et al.*, 2001).

II-2-c. Autres récepteurs auxquels se lie la ghrelina

Il existe dans la circulation des protéines capables de lier la ghrelina. Ces protéines vont influencer l'action biologique de l'hormone soit en modulant la quantité de ghrelina libre et donc capable d'activer le GHS-R1a, soit en la dégradant.

A ce jour, deux protéines de liaison ont été mises en évidence dans le plasma :

- Une protéine de liaison de haut poids moléculaire : la majorité de la ghrelina octanoylée circulerait liée à cette protéine de liaison alors que la forme non octanoylée circulerait libre (Patterson *et al.*, 2005).
- Une lipoprotéine de haute densité associée à une estérase plasmatique, la paraoxonase, et à la clusterine. Cette estérase pourrait être impliquée dans le mécanisme de conversion de la ghrelina octanoylée en ghrelina non octanoylée (Beaumont *et al.*, 2003).

Tous les effets biologiques de la ghrelina ne peuvent être expliqués par un seul et unique récepteur. Plusieurs données sont en faveur de l'existence d'un ou de plusieurs récepteurs différents du GHSR1a et du GHSR1b:

- Au niveau du cœur (rat ou humain), les sites de liaisons pour la Tyr-Ala-hexarelin ne seraient pas des récepteurs GHSR1a puisque leur affinité pour la ghrelina est très faible (Papotti *et al.*, 2000). Ce récepteur cardiaque a un poids moléculaire (84 kDa) supérieur à celui du GHSR1a (Bodart *et al.*, 1999) et sa séquence en acides aminés est similaire à celle du CD36 (Bodart *et al.*, 2002).

Tableau 1A : Principaux sites de distribution du GHS-R1a

Système nerveux central		Périphérie	
GHS-R1a		GHS-R1a	
ARN-m	Sites de liaisons	ARN-m	Sites de liaisons
Aire tegmentale ventrale Cortex piriforme Hippocampe Hypothalamus : Noyau arqué Noyau dorso et ventromédian Noyau paraventriculaire Eminence médiane Substance noire (pars compacta) Noyaux du raphé (dorsal et médian)	Cervelet Corps calleux Cortex cérébral Hippocampe Hypothalamus Medulla oblongata Plexus choroïdes Striatum Substance noire Thalamus	Aorte Estomac Glande thyroïde Glandes surrénales Hypophyse Intestin Lymphocytes Myocarde Ventriculaire Ovaires Pancréas Poumons Rate Reins Testicules Tissus adipeux Absent de : Myocarde atrial Foie Prostate Reins Reins Placenta Ganglion lymphatique Peau Muscle squelettique Veines	Artères Colon Estomac Glande thyroïde Foie Ganglion lymphatique Glandes salivaires Glandes surrénales Hypophyse Muscle squelettique Myocarde Ovaires Pancréas Parathyroïdes Peau Placenta Poumons Prostate Rate Reins Testicules Tissus adipeux Utérus Veines

D'après Smith (1997), Smith (1999), Muccioli (1998), Muccioli (2002), Wang (2002), Petersenn (2002).

- Au niveau de tumeurs thyroïdiennes et mammaires humaines la liaison de la ghreline octanoylée est déplacée par la ghreline non octanoylée qui ne se lie pas au GHS-R1a (Cassoni *et al.*, 2001; Volante *et al.*, 2003), ce qui suggère l'existence d'un site reconnaissant à fois ghreline octanoylée et ghreline non octanoylée.
- La ghreline non octanoylée a des effets spécifiques donc active un récepteur autre que le GHS-R1a (Cf effets biologiques de la ghreline).

III. Distribution du GHSR1a et de la ghreline

III-1.GHSR1a

A l'aide de différentes approches techniques (pharmacologiques, biochimiques et de biologie moléculaire) la distribution centrale et périphérique des ARNm du GHS-R1a ou de la protéine a pu être mise en évidence notamment chez le rat et chez l'homme (Tableau 1A). Ce récepteur est présent dans les structures impliquées dans le contrôle de la sécrétion d'hormone de croissance comme l'hypothalamus et l'hypophyse mais il est également détecté dans d'autres structures : l'hippocampe (Gyrus denté, CA2, CA3), l'aire tegmentale ventrale, la substance noire, et le noyau du raphé au niveau du système nerveux central et la thyroïde, l'estomac, les ovaires, les testicules, les surrénales, le cœur, les lymphocytes en périphérie. Cette distribution ubiquitaire laisse supposer que les GHS peuvent intervenir dans un nombre important de fonctions.

L'expression du GHS-R1a est plus faible au niveau hypophysaire qu'au niveau hypothalamique (Howard *et al.*, 1996; Korbonits *et al.*, 1998). A ce dernier niveau il est exprimé dans le noyau arqué, le noyau paraventriculaire, le noyau preoptique antéroventral, l'aire hypothalamique antérieure, le noyau suprachiasmatique, le noyau antérolatéral hypothalamique et le noyau tubéro-mamillaire (Bennett *et al.*, 1997; Guan *et al.*, 1997).

Les neurones impliqués dans le contrôle de la sécrétion de GH sont essentiellement localisés au niveau des noyaux arqué et périventriculaire pour la somatostatine, et arqué pour la somatolibérine, Des études de double marquage destinées à définir la localisation cellulaire du récepteur rapportent des résultats différents qui peuvent sans doute être attribués à une différence de souche et/ou de sexe. Chez la ratte Wistar, au niveau de l'ARC, le récepteur GHS-R1a est exprimé par la même proportion de neurones à GHRH (20-25%) et à SRIH (30±6 %), par la majorité des neurones à NPY (97%±1%) et très peu par les neurones à POMC (8±2%) (Willesen *et al.*, 1999). Chez des rats mâles Sprague Dawley, le pourcentage

Tableau 1B : Principaux sites de distribution de la ghrelina

Système nerveux central		Périphérie	
Ghrelina		Ghrelina	
ARN-m	Immunoréactivité	ARN-m	Immunoréactivité
Cerveau entier Cervelet Hypothalamus	Fibres au niveau Hypothalamus Noyau infundibulaire Noyau périvericulaire Couche externe de l'eminence médiane Noyau Suprachiasmatic Noyau paravericulaire Noyau supraoptique Noyau dorso et ventromédian	Estomac Intestin Coeur Glandes salivaires Glandes surrénales Hypophyse Ovaires Pancréas Testicules Absent du : Foie Poumon Reins Muscle squelettique	Aorte Cecum Colon Duodénum Estomac Foie Glande sous maxillaire Glandes surrénales Hypophyse Ileum Jéjunum Oreillette Pancréas Placenta Poumon Rein Testicule Thymus Thyroïde Ventricule Absent du : Coeur Rein Foie

D'après : Hosoda (2000), Gualillo (2001), Menyhert (2006), Ghelardoni (2006)

de neurones NPY co-exprimant le GHS-R au niveau de l'ARC n'est que de $16\pm 3\%$, pour la GHRH il est de $27\pm 2\%$, et pour la SRIH il n'est que de $6\pm 2\%$ (Tannenbaum *et al.*, 2003). Au niveau du noyau ventromédian, le GHS-R est coexprimé par $22\pm 5\%$ des neurones à GHRH et $4\pm 2\%$ des neurones à SRIH et au niveau du noyau periventriculaire par $5,2\pm 0,2\%$ des neurones à SRIH.

III-2. La ghreline (tableau 1B)

La principale source de ghreline provient de l'estomac. La ghreline présente dans la circulation diminue de 80% lorsque les cellules de la muqueuse oxintique sont détruites (Dornonville de la Cour *et al.*, 2001) ou après gastrectomie chez l'homme (Leonetti *et al.*, 2003). Cependant dans ce dernier cas une réaugmentation graduelle du niveau de ghreline a été observée après l'intervention (Hosoda *et al.*, 2003) suggérant que d'autres tissus peuvent compenser la perte de production de ghreline par l'estomac. D'ailleurs des ARNm codant pour la ghreline sont également retrouvés au niveau de l'intestin (duodenum, ileum, colon), du cœur, du pancréas, des surrénales, des glandes salivaires et des ovaires/testicules. La protéine est détectée dans tous ces organes à l'exception du coeur et également dans le poumon et le muscle (Ghelardoni *et al.*, 2006).

Très vite, s'est posée la question de l'origine de la ghreline qui agit au niveau du cerveau (périphérique ou centrale ?). En 2002 Banks et col en injectant de la ghreline soit à la périphérie, soit directement dans le cerveau et en la mesurant dans le cerveau (ce qui correspond à celle qui est transportée dans le premier cas, à celle qui reste dans le deuxième cas) montrent que la ghreline octanoylée humaine serait transportée à travers la barrière hémato-méningée par un système saturable qui fonctionnerait dans les deux sens. Néanmoins dans cette expérience la ghreline de souris qui ne diffère de la ghreline humaine que par deux acides aminés, ne pourrait traverser que dans le sens cerveau-sang. La ghreline non octanoylée quant à elle serait transportée passivement (Banks *et al.*, 2002). Cependant il faut noter que dans les structures riches en GHS-R, comme le noyau arqué, la barrière est moins imperméable. Il a ainsi été montré qu'entre 68 et 82% des neurones qui répondaient au GHRP6 par une augmentation de l'expression de c-fos étaient marqués par un marqueur rétrograde, le fluorogold, injecté à la périphérie (Dickson *et al.*, 1996). L'importance de l'intégrité du nerf vague a également été rapportée puisque les effets de la ghreline sur la sécrétion de GH sont abolis chez le rat après lésion de cette voie (Date *et al.*, 2002). Cependant ces derniers résultats n'ont pas été confirmés chez l'homme (Takeno *et al.*, 2004).

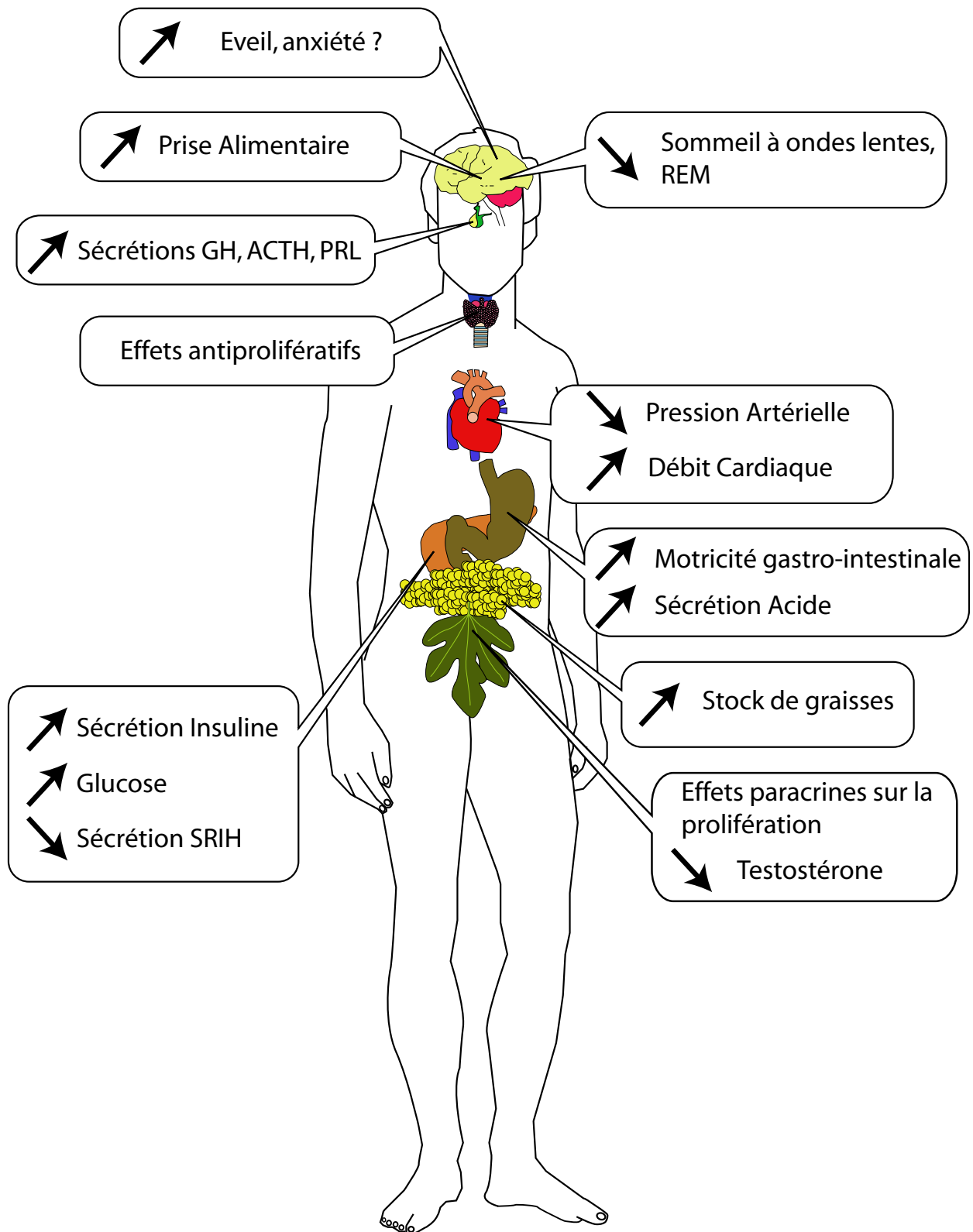


Figure 17 : Effets pléiotropes de la ghréline et des sécrétagogues de la GH. L'acylation de la ghréline est nécessaire aux effets centraux, aux sécrétions hypophysaires, à la prise alimentaire et à certains effets métaboliques et gastro-intestinaux. La forme non acylée est impliquée dans l'adipogenèse, les effets cardiovasculaires et les phénomènes de prolifération/différenciation.

Une production centrale de ghreline ne peut être exclue. Des corps cellulaires contenant de la ghreline au niveau de la partie ventrolatérale du noyau arqué ont été mis en évidence après blocage du transport axonal par la colchicine, (Kojima *et al.*, 1999). Des corps cellulaires ghreline positifs ont également été décrits au niveau du noyau périventriculaire mais également des prolongements au niveau du noyau périventriculaire, des parties magno et parvocellulaire du noyau paraventriculaire, de l'hypothalamus latéral, de la région perifornicale, de l'aire retrochiasmatic, de l'arcé, et des noyau dorso et ventro médian (Cowley *et al.*, 2003). Enfin la ghreline semble libérée à partir d'explants hypothalamiques, en condition basale et après une dépolarisation potassique (Mozid *et al.*, 2003).

IV. Effets biologiques de la ghreline exogène (figure 17)

IV-1. Effet sur la libération de GH.

Seules les formes octanoylées sont capables de stimuler la sécrétion de GH, les formes non octanoylées sont inactives (Hosoda *et al.*, 2000; Hosoda *et al.*, 2003). La ghreline a surtout une action centrale : *in vivo* elle stimule la sécrétion de GH d'un facteur compris entre 20 et 50 alors qu'*in vitro* elle n'augmente la sécrétion de GH que d'un facteur 2 (Tolle *et al.*, 2001).

Chez le rat, la ghreline est capable de stimuler la sécrétion d'hormone de croissance quelque soit le tonus somatostatinergique. En effet elle est efficace, d'une part, en période de sécrétion basale de GH qui correspond à un moment où le tonus somatostatinergique est élevé et en période de pic qui correspond à un moment où le tonus somatostatinergique est bas et, d'autre part, lors d'un stress à l'éther, condition qui induit une augmentation du tonus somatostatinergique chez le rat. Ces résultats suggèrent que la ghreline est capable d'antagoniser les effets de la somatostatine, peut-être par une diminution de la libération de somatostatine (Tolle *et al.*, 2001).

L'action de la ghreline nécessite par ailleurs un système à GHRH intact puisqu'après immunisation passive contre la GHRH, son action est fortement bloquée (Tannenbaum *et al.*, 2003).

Chez le rat, la ghreline, administrée par voie IV, stimule uniquement la sécrétion de GH. Elle est sans effet sur les sécrétions de prolactine, d'ACTH et de leptine (Tolle *et al.*, 2001). Par contre injectée par voie ICV elle stimule également la sécrétion d'ACTH suggérant une action uniquement au niveau central en ce qui concerne cette hormone (Wren *et al.*, 2000). D'ailleurs *in vitro*, la ghreline stimule les sécrétions de CRH et d'AVP à partir d'explants

hypothalamiques (Wren *et al.*, 2002), il est possible que la localisation anatomique de ces neurones les rende moins accessibles que ceux à GHRH à la ghreline périphérique. Néanmoins chez l'homme la ghreline en IV stimule aussi bien les sécrétions de GH, de prolactine et d'ACTH (Arvat *et al.*, 2001) et la sécrétion d'ACTH est précédée d'une augmentation d'AVP (Coiro *et al.*, 2005).

IV-2. Effet orexigénique

Comme pouvait le laisser prévoir la localisation des récepteurs GHS-R au niveau des neurones à NPY du noyau arqué, la ghreline s'est révélée être un puissant facteur orexigénique. Précédemment une augmentation de la prise alimentaire après administration de différents GHS synthétiques avaient été rapportés sans qu'un grand intérêt y soit porté (Locke *et al.*, 1995; Okada *et al.*, 1996; Shibasaki *et al.*, 1998).

Dans toutes les études publiées à ce jour à l'exception d'une étude faite chez le poulet à un stade précoce de la vie (Geelissen *et al.*, 2006) l'administration de ghreline octanoylée stimule la prise alimentaire. Cet effet ne ferait pas intervenir la sécrétion de GH puisqu'il est plus rapide que cette dernière (Tolle *et al.*, 2002) et qu'il est observé chez le rat déficient en GH (Shintani *et al.*, 2001). Il est principalement dû à une activation des récepteurs NPY - Y1. En effet il est aboli après co-administration d'un antagoniste des récepteurs NPY-Y1 (Shintani *et al.*, 2001) et après destruction des neurones exprimant les récepteurs du NPY, par la saporine, une toxine inactivant le ribosome, (Bugarith *et al.*, 2005).

Contrairement à ce qui a été montré pour la GH la ghreline non octanoylée pourrait également jouer un rôle dans la régulation du comportement alimentaire néanmoins les résultats obtenus à ce jour sont divergents. Un effet stimulateur n'a été observé que dans une étude chez le rongeur après administration ICV du peptide (Toshinai *et al.*, 2006). D'après ces auteurs cet effet passerait par l'activation des neurones à orexine de l'hypothalamus latéral puisque l'administration de ghreline non octanoylée stimule l'expression de c-fos dans ces neurones, et qu'elle n'est plus capable de stimuler la prise alimentaire chez la souris déficiente en orexine alors qu'elle est encore capable de le faire chez la souris déficiente en NPY (Toshinai *et al.*, 2006). Un effet inhibiteur a lui été rapporté dans plusieurs modèles : Chez le rat (Chen *et al.*, 2005) et la souris (Asakawa *et al.*, 2005), après un jeûne de 16 heures et dans le premier cas l'effet est aboli par un antagoniste du récepteur CRF2 ; chez le poisson rouge où la ghreline non octanoylée est capable de bloquer l'action orexigène de la ghreline octanoylée (Matsuda *et al.*, 2006). Enfin une absence d'effet est aussi rapporté chez des souris nourries ad libitum ou après 20 heures de jeûne (Neary *et al.*, 2006).

IV-3. Effet sur le métabolisme énergétique

Chez le rongeur l'administration chronique de ghreline entraîne une augmentation de la masse corporelle (Kamegai *et al.*, 2001). Cette augmentation de poids n'est pas due à une augmentation de la croissance longitudinale mais à une augmentation de la masse grasse sans modification de la masse maigre (Dornonville de la Cour *et al.*, 2005), d'ailleurs elle est également observée chez le rat Dwarf (Tschop *et al.*, 2000). Une seule injection de ghreline est capable d'augmenter le quotient respiratoire, ce qui traduit une augmentation de l'utilisation des glucides et une diminution de l'utilisation des graisses. Il semble que cet effet soit un effet central puisqu'en ICV des doses 1000 plus faibles que celles utilisées IV, sont capables d'augmenter la masse corporelle et le quotient respiratoire (Tschop *et al.*, 2000).

La ghreline non octanoylée comme la ghreline octanoylée, est capable d'augmenter l'adipogenèse au niveau de la moelle osseuse (Thompson *et al.*, 2004).

IV-4. Autres effets de la ghreline

- Sur l'état de vigilance.

La ghreline tout comme les GHS paraît capable de moduler le sommeil à différents stades mais les résultats sont divergents sauf en ce qui concerne le sommeil paradoxal pour lequel la ghreline diminue la durée aussi bien chez le rat que chez l'homme (Tolle *et al.*, 2002) (Weikel *et al.*, 2003). Chez le rat la ghreline diminue le sommeil à ondes lentes et augmente la veille active durant des périodes où les animaux sont généralement en train de dormir (durant la phase diurne) (Tolle *et al.*, 2002). Cet effet sur l'état de vigilance pourrait être dû à l'effet orexigène de la ghreline puisqu'il a été montré que des peptides orexigènes comme l'orexine (Sakurai, 2002), le neuropeptide Y (Szentirmai et Krueger, 2006) sont capables de promouvoir l'éveil alors que des peptides anorexigènes comme la CCK (Kapas *et al.*, 1988), la leptine (Sinton *et al.*, 1999), et l'insuline (Danguir et Nicolaidis, 1984) favorisent le sommeil à ondes lentes. A l'inverse chez l'homme des injections répétées de ghreline (Weikel *et al.*, 2003) ou de GHRP6 (Frieboes *et al.*, 1999) augmentent le sommeil, alors qu'un bolus de GHRP2 n'a pas d'effet sur l'état de vigilance (Moreno-Reyes *et al.*, 1998). Les mécanismes qui sont impliqués dans ces effets restent à élucider.

- Sur l'anxiété

La ghreline pourrait être anxiogène via une activation des neurones à CRH. En effet, chez la souris, des injections de ghreline octanoylée entraînent une augmentation des comportements anxiogènes évalués par le test du labyrinthe en croix surélevé et cet effet est bloqué par un antagoniste des récepteurs CRH (Asakawa *et al.*, 2001). Par ailleurs une administration de ghreline entraîne une augmentation des ARN-m pour la CRH, et de la libération de corticostérone in vivo (Asakawa *et al.*, 2001) et une stimulation de la libération de CRH par des hypothalami périfusés in vitro (Mozid *et al.*, 2003).

- Sur la prolifération cellulaire

La ghreline, octanoylée ou non, ainsi que les GHS sont capables soit d'inhiber (thyroïde) soit de stimuler (hepatome, prostate) la prolifération de certaines lignées tumorales (Murata *et al.*, 2002; Volante *et al.*, 2003) (Jeffery *et al.*, 2002).

- Sur le système cardiovasculaire

La ghreline et les GHS ont des effets bénéfiques sur les paramètres cardiovasculaires chez le rat et chez l'humain (Cao *et al.*, 2006). Dans des modèles d'ischémie l'hexareline a un effet protecteur, elle prévient la mort cellulaire (Pang *et al.*, 2004).

Ces effets sont, au moins en partie, indépendants de ceux de la GH puisqu'ils sont observés chez le sujet hypophysectomisé (Locatelli *et al.*, 1999).

La ghreline non octanoylée est également capable d'inhiber la mort cellulaire des cardiomyocytes et des cellules endothéliales (Baldanzi *et al.*, 2002), elle a un effet hypotenseur au niveau du NTS (Tsubota *et al.*, 2005).

- Sur le complexe gastro-entéro pancréatique

La ghreline présente une grande homologie avec la motiline, tout comme le récepteur des GHS présente une grande homologie avec le récepteur de la motiline. Ces homologies pourraient expliquer pourquoi il existe des similarités entre l'activité de la ghreline et celle de la motiline. La ghreline tout comme la motiline est capable de stimuler la motilité gastrique (Trudel *et al.*, 2002) et la vidange gastrique (Asakawa *et al.*, 2001). Elle stimule également l'acidité gastrique (Date *et al.*, 2001; Masuda *et al.*, 2000), cette stimulation pourrait être la conséquence de l'augmentation de gastrine induite par la ghreline

La ghreline et son récepteur sont présents au niveau du pancréas. La ghreline semble affecter les îlots pancréatiques, par l'intermédiaire de la circulation systémique ou via des effets paracrines (Date *et al.*, 2002). Chez le rat elle inhibe la sécrétion d'insuline à partir

Tableau 2 : Facteurs impliqués à la fois dans le contrôle de la prise alimentaire et dans le contrôle de la sécrétion de GH

	PA	GH	SRIH	GHRH	NPY	POMC
Neuropeptides						
GHRH	-/+ ¹	+ ²	+ ³	- ⁴		
SRIH	-/+ ⁵	- ⁶	- ⁷	+ ⁸		
NPY	+ ⁹	- ¹⁰	+ ¹¹	- ¹²		
CRH	- ¹³	- ¹⁴	+ ¹⁵	- ¹⁶		
Galanine	+ ¹⁷	+ ¹⁸	- ¹⁹	+ ²⁰		
Opiacés	-/+ ²¹	+ ²²	- ²³	+ ²⁴		
α -MSH	- ²⁵	= ²⁶ /+ ²⁷				
AgRP	+ ²⁸	= ²⁹				
GLP-1	- ³⁰	= ³¹				
CART	- ³²	+ ³³				
Neurotransmetteurs						
NA/A						
α 1	- ³⁴	- ³⁵				
α 2	+ ³⁶	+ ³⁷	= ³⁸	+ ³⁷		
β 2	- ³⁶	- ³⁹	+ ⁴⁰			
DA	- ⁴¹	-	+ ⁴²			
5HT	- ⁴³	+ ⁴⁴		+ ⁴⁷		
Ach	+ ⁴⁵	+ ⁴⁶	- ⁴⁷			
Facteurs périphériques						
Leptine	- ⁴⁸	+ ⁴⁹	- ⁵⁰		- ⁵¹	+ ⁵²
Ghreline	+ ⁵³	+ ⁵⁴	- ⁵³	+ ⁵⁵	+ ⁵⁶	- ⁵⁷
IGF-1	= ⁵⁸	- ⁵⁹	= ⁶⁰	= ⁶⁰	= ⁶¹	
GH	+ ⁶²	- ⁶³	+ ⁶³		+ ⁶⁴	
Glucose	- ⁶⁵				- ⁶⁶	= ⁶⁷
Insuline	- ⁶⁸				- ⁶¹	+ ⁶⁹

¹ Tanaka (1991), ² Guillemain (1982), ³ Mitsugi (1990), ⁴ Uchiyama (1994), ⁵ Feifel (1990), ⁶ Brazeau (1972), ⁷ Peterfreund (1984), ⁸ Lumpkin (1981), ⁹ Levine (1984), ¹⁰ McDonald (1985), ¹¹ Rettori (1990), ¹² Korbonits (1999), ¹³ Krahn (1990), ¹⁴ Rivier (1984), ¹⁵ Katakami (1985), ¹⁶ Mounier (1997), ¹⁷ Kyrkouli (1990), ¹⁸ Ottecz (1986), ¹⁹ Tanoh (1993), ²⁰ Murakami (1987), ²¹ Sanger (1980), ²² Martin (1975), ²³ Moldow (1981), ²⁴ Wehrenberg (1985), ²⁵ Poggioli (1986), ²⁶ Panerai (1976), ²⁷ Volosin (1988), ²⁸ Ollmann (1997), ²⁹ Tamura (2005), ³⁰ Turton (1996), ³¹ Beak (1996) au niveau hypophysaire, ³² Lambert (1998), ³³ Stanley (2001), ³⁴ Davies (1992), ³⁵ Mounier (1994), ³⁶ Tsujii (1992), ³⁷ Miki (1984), ³⁸ Guistina (1992), ³⁹ Haug (1983), ⁴⁰ Richardson (1990), ⁴¹ Heffner (1977), ⁴² Kitajima (1989), ⁴³ Samanin (1979), ⁴⁴ Murakami (1986), ⁴⁵ Winn (1983), ⁴⁶ Bruni (1978), ⁴⁷ Richardson (1980), ⁴⁸ Pellemounter (1995), ⁴⁹ Carro (1997), ⁵⁰ Saleri (2004), ⁵¹ Schwartz (1996), ⁵² Schwartz (1997), ⁵³ Tolle (2001), ⁵⁴ Tschöp (2000), ⁵⁵ Tannenbaum (2003), ⁵⁶ Nakazato (2001), ⁵⁷ Cowley (2003), ⁵⁸ Lauterio (1987), ⁵⁹ Abe (1983), ⁶⁰ Minami (1997), ⁶¹ Sahu (1995), ⁶² Bohlouly-Y (2005), ⁶³ Pellegrini (1996), ⁶⁴ Chan (1996), ⁶⁵ Kurata (1986) et Davis (1981), ⁶⁶ Minami (1995), ⁶⁷ Sergeev (2000), ⁶⁸ Brief (1984), ⁶⁹ Benoit (2002)

d'îlots pancréatiques isolés (Egido *et al.*, 2002). Chez l'homme elle diminue la sécrétion d'insuline et cette diminution est associée à une hyperglycémie (Broglia *et al.*, 2001). Chez le sujet âgé, le MK0677 induit également une hyperglycémie (Svensson, 1998). Ainsi la ghreline pourrait intervenir dans le métabolisme du glucose et jouer un rôle déterminant dans la régulation de la réponse neuroendocrine et métabolique au jeûne.

En conclusion la ghreline recherchée pendant des années comme ligand endogène du récepteur des GH sécrétagogues et donc en tant que tel comme stimulateur de la sécrétion d'hormone de croissance s'est très vite révélée être une hormone orexigène et adipogène. Ainsi la ghreline, hormone principalement d'origine gastrique, venait elle compléter la liste des nombreux facteurs impliqués à la fois dans la régulation de la sécrétion de GH et dans la régulation du comportement alimentaire (Tableau2)

OBJECTIF DE CE TRAVAIL

Lorsque nous avons entrepris ce travail de thèse seuls les effets induits par une administration aigue ou chronique de ghreline exogène étaient connus, le rôle de la ghreline endogène n'avait pas été caractérisé. Notre objectif a été

- de tenter de définir le rôle de la ghreline endogène dans la régulation d'une part de la sécrétion d'hormone de croissance et d'autre part du comportement alimentaire (1^{ère} partie),
- d'évaluer en retour l'impact de l'altération de ces fonctions sur la sécrétion de ghreline (2^{ème} partie)
- de rechercher l'implication de la ghreline en physiopathologie et en particulier si des polymorphismes dans le gène de la preproghreline pouvaient être associés à la vulnérabilité de certains sujets vis-à-vis de l'anorexie (4^{ème} partie).

Nous rapportons également dans ce mémoire les premiers résultats (3^{ème} partie) que nous avons obtenu avec l'obestatine, un peptide découvert très récemment et issu du même précurseur que la ghreline. Dans la mesure où l'obestatine a été décrite comme ayant une action opposée à celle de la ghreline sur la prise alimentaire son existence pourrait peut être expliquer, au moins en partie, pourquoi le rôle de la ghreline endogène est aussi difficile à mettre en évidence.

RESULTATS

1^{ère} partie

La ghreline endogène: sa sécrétion et sa relation avec la sécrétion de GH et la prise alimentaire

Article 1 : Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology*. 2002 Apr;143(4):1353-61

Article 2 : Zizzari P, Halem H, Taylor J, Dong JZ, Datta R, Culler MD, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. Endogenous ghrelin regulates episodic growth hormone (GH) secretion by amplifying GH Pulse amplitude: evidence from antagonism of the GH secretagogue-R1a receptor. *Endocrinology*. 2005 Sep;146(9):3836-42

Article 1 : Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology*. 2002 Apr;143(4):1353-61

Ultradian Rhythmicity of Ghrelin Secretion in Relation with GH, Feeding Behavior, and Sleep-Wake Patterns in Rats

VIRGINIE TOLLE, MARIE-HELENE BASSANT, PHILIPPE ZIZZARI, FREDERIQUE POINDESSOUS-JAZAT, CATHERINE TOMASETTO, JACQUES EPELBAUM, AND MARIE-THERESE BLUET-PAJOT

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U549 (V.T., M.-H.B., P.Z., F.P.-J., J.E., M.-T.B.-P.), Institut Fédératif de Recherche Broca-Sainte Anne, 75014 Paris, France; and Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (C.T.), Centre National de la Recherche Scientifique/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U184/Université Louis Pasteur, Illkirch 67404, France

Ghrelin, an endogenous ligand for the GHS receptor, stimulates GH secretion and gastrointestinal motility and has orexigenic effects. In this study, the relationships between ghrelin, GH secretion, feeding behavior, and sleep-wake patterns were investigated in adult male rats. The half-life of exogenous ghrelin (10 μ g iv) in plasma was about 30 min. Repeated administration of ghrelin at 3- to 4-h intervals (one during lights-on and two during lights-off periods) increased GH release and feeding activity, and decreased rapid eye movement sleep duration. Endogenous plasma ghrelin levels exhibited pulsatile variations that were smaller and less regular compared with those of GH. No significant correlation between GH and ghrelin circulating levels was found, although mean interpeak intervals and pulse frequencies were close for the

two hormones. In contrast, ghrelin pulse variations were correlated with food intake episodes in the lights off period, and plasma ghrelin concentrations decreased by 26% in the 20 min following the end of the food intake periods. A positive correlation between ghrelin levels and active wake was found during the first 3 h of the dark period only. In conclusion, ghrelin, in addition to affecting GH secretion, gastrointestinal motility, and feeding activity, also modifies sleep-wake patterns. However, a direct action of ghrelin *per se* or the indirect effects of feeding (and all of its attendant metabolic sequelae) on sleep cannot be differentiated. Moreover, ghrelin secretion is pulsatile and directly related to feeding behavior only. (*Endocrinology* 143: 1353–1361, 2002)

GHRELIN, a 28-amino acid acylated peptide purified from the stomach, is an endogenous ligand for the GH secretagogue receptor (GHS-R) (1) and exhibits structural resemblance to motilin, a 22-amino acid peptide involved in the regulation of interdigestive motility (2). A few ghrelin immunoreactive neurons have been visualized in the hypothalamus in arcuate parvocellular neurons (1) and in paraventricular and supraoptic magnocellular neurons (3), but the bulk of the peptide expression is restricted to the stomach (4). In the central nervous system, ribonuclease protection assays specifically revealed the presence of GHS-R mRNA in the hypothalamus, hippocampus, and some brain stem nuclei (5, 6). Major *in situ* hybridization signals were detected in the hypothalamus as well as in the pituitary gland (6, 7). Highest specific binding of the synthetic GHS-R ligand, ¹²⁵I-hexarelin, was found in the human hypothalamus and pituitary gland (8). In the rat hypothalamus, the expression of the GHS-R has been defined in the arcuate nucleus and ventromedial nucleus (6, 7), although precise localization of GHS-R mRNA within subsets of these hypothalamic nuclei remains uncertain. Expression of GHS-R mRNA in rat pituitary gland and certain regions of the rat hypothalamus, such

as the paraventricular and periventricular nuclei, is still a matter of debate, though the human pituitary gland and pituitary adenomas do express GHS-R mRNA (9, 10).

In rodents, ghrelin has recently been shown not only to stimulate GH secretion (11, 12) but also to exert gastroprokinetic (13), orexigenic, and adipogenic effects (14–16). Effects on GH secretion (17–20) and feeding behavior (21–23) are also observed in the human species. As recently reviewed, the dual action on GH secretion and food intake as well as the dual localization of ghrelin and its receptors in hypothalamus and stomach immediately raise the question of the interdependency of these actions (24). Many studies have linked nutrition and episodic GH secretion although these relationships vary from species to species, undernutrition reducing GH pulsatility in the rat, while the converse is true in humans (25). One common property of feeding behavior and GH secretion is their rhythmicity. The pulsatile mode of GH secretion depends primarily on the coordinate actions of hypothalamic GHRH and somatostatin (SRIF) release from median eminence terminals but multiple intra and extra pituitary regulatory signals and diurnally varying neuronal inputs related to the sleep-wake pattern are also involved (26, 27). In return, feeding behavior is also dependent on the interaction of regulatory signals, including sleep-wake patterns, and diurnally neuronal inputs on a complex array of hypothalamic peptidergic neurons (28).

In the present work, we attempted to determine the rela-

Abbreviations: ApEn, Approximate entropy; AUC, area under the curve; AW, active wakefulness; EEG, electroencephalogram; EMG, electromyogram; GHS-R, GH secretagogue receptor; QW, quiet wakefulness; REM, rapid eye movement; SRIF, somatostatin; SWS, slow wave sleep; X-ApEn, cross-approximate entropy.

tionships between ghrelin and the ultradian rhythmicity of GH secretion, feeding behavior, and sleep-wake cycle in freely moving rats sampled for 9 h, the first three corresponding to the end of the lights-on period and the last six to a lights-off period. This schedule was chosen to observe behavioral parameters in both light and dark periods because 1) feeding and sleep-wake patterns differ considerably in these two conditions; and 2) GH secretion in rats is remarkably entrained to the light/dark cycle. In a first series of experiments, we analyzed the effect of repeated ghrelin administrations in the lights-on and lights-off periods on these parameters. In a second series of experiments, we measured ghrelin plasma levels and analyzed its pulsatile and entropic modes in comparison with those of GH, feeding, and sleep-wake states.

Materials and Methods

Four weeks before sampling experiments, adult male Sprague Dawley rats weighing 100–125 g (Charles River Laboratories, Inc., St. Aubin les Elbeuf, France) were housed individually in transparent plastic containers placed in a sound-proof room with controlled temperature (22–24 C) and illumination (12-h light, 12-h dark schedule with lights off at 1300 h). They had free access to food and water and were regularly handled and weighed, to minimize stress effects.

Surgery and experimental procedures

Two weeks before the experiments, electrodes for recording the electroencephalogram (EEG) and electromyogram (EMG) were implanted. Rats were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg), placed into a stereotaxic frame and maintained at 37 C with an isothermal heating pad. Bipolar electrodes were placed in the right and left dorsal hippocampus (stratum lacunosum moleculare). A stainless steel screw was inserted into the skull above the right parietal cortex. Another screw placed on the occipital crest served as reference. A stainless steel hook soldered to fine flexible insulated silver wires was placed in the neck muscles to record EMG. All recording electrodes were soldered to a connector. A liquid bonding resin (Superbond, Sun Medical Co., Tokyo, Japan) was applied to the cleaned, dried skull surface. The hardened resin was subsequently covered with a layer of acrylic cement. The connector was embedded in a mound of acrylic cement and firmly jointed to the rat skull. The rat was removed from the stereotaxic frame and allowed to recover from anesthesia. Cephalosporin (cefuroxime 60 mg/kg) was administered *im* every 2 d during a week.

During the following week, rats were connected to a rotating collector by a flexible cable allowing a maximum amount of freedom and gradually habituated to the recording conditions.

Experiments were performed on freely moving rats. Two days before data collection, an indwelling cannula was inserted into the right atrium under ether anesthesia as previously described (29).

In a preliminary experiment, the half-life of ghrelin in plasma was determined. Ten micrograms of ghrelin were *iv* injected to four rats and blood samples collected 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, and 120 min after the injection.

In a first experiment, rats received *iv* injection of ghrelin (10 μ g/rat) or saline at 1020 h, 1420 h, and 1720 h and GH secretion, feeding behavior and sleep-wake pattern were evaluated. Two hours before the sampling and recording period, the distal extremity of the cannula was connected to a polyethylene catheter filled with 25 IU/ml heparinized saline. Recording electrodes were connected to a polygraph via the rotating collector. From 1000–1900 h, EEG and EMG were continuously recorded and blood samples were withdrawn every 20 min. Blood samples were centrifuged immediately. Red blood cells were resuspended in saline and reinjected every hour to attenuate hemodynamic modifications. Plasma was stored at –20 C until GH assays.

In a second experiment, blood was sampled in the same schedule to determine the endogenous ghrelin secretion in addition to the other parameters.

Analysis of sleep-wake patterns

Polygraph records were scored in 20-sec epochs by visual analysis. Four states of arousal were differentiated: active wakefulness (AW), characterized by cortex low-voltage activity, hippocampal theta activity (6–8 Hz), motor activity with high muscular tone (EMG); quiet wakefulness (QW), characterized by nonmotivated motor activity associated to low voltage EEG and absence of hippocampal theta; slow wave sleep (SWS), characterized by high-amplitude low frequency EEG intermingled with spindles and reduced voltage EMG; rapid eye movement (REM) sleep, identified by hypersynchronous theta waves, loss of muscular tone, jerks of jaw muscles, and vibrissae at the end of the episode.

The total durations of the four states of vigilance were calculated on the basis of the overall session and during either the lights-on or the dark periods. For clarity, AW and QW were represented together as wakefulness. The total number of REM sleep episodes and the duration of each bout were calculated. Temporal relations between the occurrence and length of eating episodes and hormonal parameters (GH, endogenous, and exogenous ghrelin) were determined.

Feeding behavior

Rats were freely fed. Food intake episodes were constantly monitored by two researchers during the course of the experiments. Food intake was measured at the end of the sampling period.

Hormonal determinations

Plasma GH concentrations were measured by EIA as previously described (30). Values are reported in terms of rGH-RP2, with sensitivity of 5 ng/ml and intra and interassay coefficients of variation below 7%.

Plasma ghrelin concentrations were determined using RIA kits (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA). The sensitivity was 53 pg/ml. The intra and interassay coefficients of variation were below 10%.

Statistical analysis

Ghrelin and GH pulse analysis was performed using the Cluster program (31) setting the *t* value to 2 to maintain false positive rates under 1%. Cluster size was set to two prepeak and two postpeak nadir values. False positive error for peak detection was 7%.

Regularity of GH, ghrelin, and food intake pattern was estimated by determination of approximate entropy (ApEn) and cross-approximate entropy (X-ApEn) (32). The series containing 54 observations, ApEn and X-ApEn were calculated using *r* (tolerance for detecting pattern recurrence) = 20% and *m* (pattern length) = 1.

Areas under the GH response curves (AUC) were calculated by mean of trapezoidal analysis.

Values are given as means \pm SEM and statistical analysis was performed by ANOVA and paired *t* test using the statview 4.5 software (Abacus Concepts, Palo Alto, CA).

Results

*Effect of *iv* ghrelin administration on GH secretion, feeding behavior, and states of arousal*

Determination of plasma ghrelin concentrations from 5–120 min after ghrelin administration (10 μ g, *iv*) showed that the half-life of the peptide was about 30 min (Fig. 1).

Administration of ghrelin (10 μ g *iv*) at 1020 h (light period), 1420 h, and 1720 h (dark period) always resulted in a rapid modification of GH release, feeding behavior and sleep-wake pattern.

Ghrelin stimulated GH secretion (Fig. 2), and the amplitude of the response was identical after the different injections (AUC during the 40-min period following the administration: 7476 \pm 1788, 9461 \pm 1222, and 8027 \pm 1826, respectively).

Rats began to eat immediately after each ghrelin injection (Fig. 3). Within the 30 min following injection, food intake

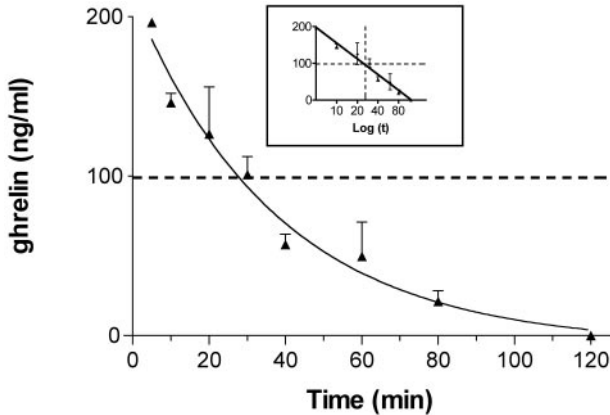


FIG. 1. Determination of exogenous ghrelin half-life in rat plasma. Ghrelin immunoreactivity was detected by RIA in rat plasma after iv injection of 10 μ g synthetic peptide. Data are expressed as ghrelin concentrations (ng/ml) measured immediately after injection. Values are the means \pm SEM of four determinations. A semilogarithmic plot of the data is given in the inset.

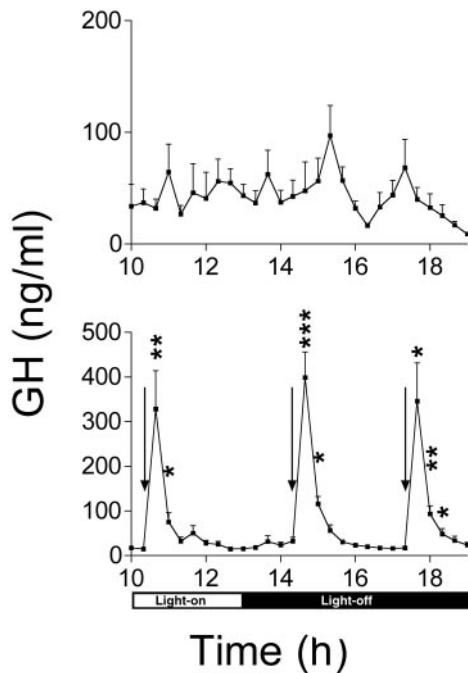


FIG. 2. Effects of iv injections of ghrelin on the endogenous pattern of GH secretion. Mean 9-h profiles of plasma GH levels in freely moving rats that received saline (top panel, $n = 7$) or ghrelin (arrows) (10 μ g/rat) (bottom panel, $n = 8$) at 1020 h, 1420 h, and 1720 h with lights off at 1300 h. Blood samples were collected every 20 min. Values correspond to mean \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ treated vs. controls.

always lasted longer in ghrelin-treated animals than in controls (Table 1).

In the lights-on and the beginning of the lights-off period, wakefulness was increased and slow wave sleep decreased during the 30 min after ghrelin injection (Fig. 4 and Table 1). A decrease in REM duration was observed after ghrelin injection only at 1420 h. In this case, within the hour following ghrelin injection, the mean number of REM episodes was not different (8.4 ± 2.2 vs. 10.0 ± 1.2 in controls), but their

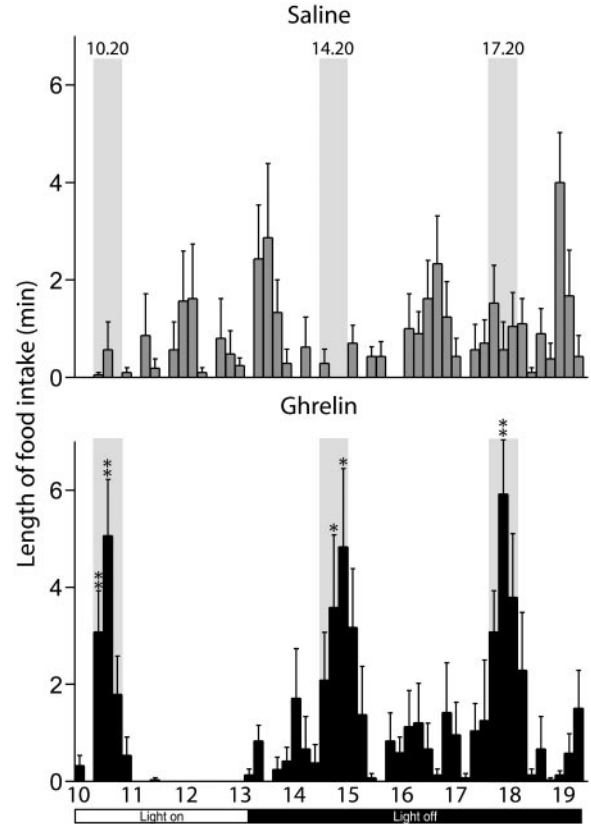


FIG. 3. Effects of iv injections of ghrelin on feeding activity. Duration of food intake was monitored constantly and expressed at 10-min intervals in rats that received saline (top panel, $n = 7$) or ghrelin (10 μ g/rat) (bottom panel, $n = 8$) at 1020 h, 1420 h, and 1720 h with lights off at 1300 h. Gray-tone areas represent the 30 min following ghrelin injections. Values correspond to mean \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ treated vs. controls.

mean duration was significantly decreased (43.3 ± 10.7 vs. 88.3 ± 7.4 sec, $P < 0.01$).

During the 9-h observation period, the total amount of released GH was greater in treated animals (AUC, 38682 ± 4499 vs. 23372 ± 2613 ; $P < 0.01$). The duration of food intake was not significantly higher (60 ± 9 vs. 37 ± 7 min, $P = 0.06$), and the quantity of food ingested not different (4.6 ± 0.8 vs. 4.8 ± 0.7 g). Total duration of wakefulness (289 ± 12 vs. 246 ± 16 min) and SWS (231 ± 10 vs. 255 ± 13 min) were unchanged, but REM sleep was significantly decreased (20.0 ± 3.8 vs. 38.4 ± 5.2 min, $P < 0.001$). The mean number of REM sequences remained unchanged (20.9 ± 2.8 vs. 26.4 ± 3.9), whereas the mean duration of each sequence was markedly decreased (56.0 ± 8.1 vs. 98.9 ± 9.4 sec, $P < 0.01$).

Relation between endogenous plasma ghrelin levels, GH secretion, feeding behavior, and states of arousal

Individual profiles of GH and ghrelin secretion are displayed on Fig. 5. Plasma ghrelin levels, sampled every 20 min during 9 h, exhibited pulsatile variations of moderate amplitude when compared with those of GH secretion (Figs. 5 and 6).

No correlation between GH and ghrelin secretory patterns was found. However, on the 8 rats sampled, 6 had GH peaks

TABLE 1. Effects of ghrelin (10 μ g/rat) injected in light and dark periods on feeding behavior and sleep

	Time of injection	Food intake (min)	Wakefulness (min)	SWS (min)	REM (min)
Saline (n = 7)	1020 h	0.6 \pm 0.6	10.7 \pm 3.1	19.2 \pm 2.9	0.3 \pm 0.3
	1420 h	0.3 \pm 0.3	8.0 \pm 1.8	16.4 \pm 1.1	5.4 \pm 0.9
	1720 h	3.1 \pm 1.6	21.7 \pm 2.2	7.1 \pm 1.8	1.2 \pm 0.5
Ghrelin (n = 8)	1020 h	9.9 \pm 2.2 ^b	20.5 \pm 1.6 ^c	9.5 \pm 1.6 ^b	0.0 \pm 0.0
	1420 h	10.5 \pm 2.6 ^b	23.4 \pm 2.5 ^c	6.9 \pm 2.6 ^b	0.4 \pm 0.3 ^c
	1720 h	12.8 \pm 2.0 ^b	25.3 \pm 1.1	3.9 \pm 1.0	0.8 \pm 0.4

Data represent the duration of food intake, wakefulness, slow wave sleep (SWS), and REM sleep during 30 min after ghrelin injection (mean \pm SEM).

^a $P < 0.05$ ghrelin *vs.* saline, ^b $P < 0.01$ ghrelin *vs.* saline, ^c $P < 0.001$ ghrelin *vs.* saline.

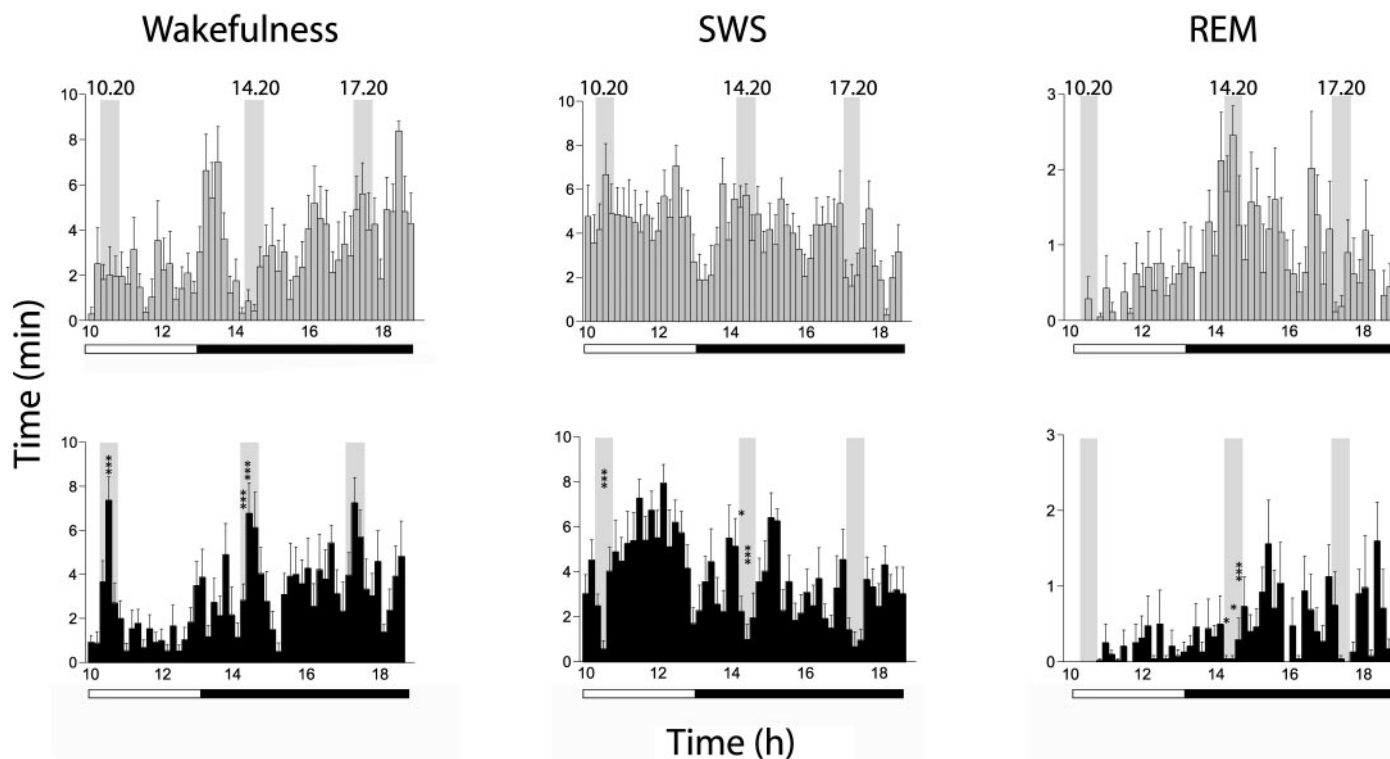


FIG. 4. Effects of iv injections of ghrelin on sleep-wake pattern. Duration of wakefulness, SWS and REM sleep were monitored constantly and expressed at 10-min intervals in rats that received saline (*top panel*, n = 7) or ghrelin (10 μ g/rat) (*bottom panel*, n = 8) at 1020 h, 1420 h, and 1720 h with lights off at 1300 h. *Gray-tone areas* represent the 30-min following ghrelin injections. Values correspond to mean \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ treated *vs.* controls.

of high amplitude (126 \pm 15 ng/ml) and 2 of low amplitude (19 \pm 2 ng/ml). Interestingly, the mean ghrelin concentration was higher in the group with large GH peaks (1290 \pm 349 and 812 \pm 144 pg/ml, respectively).

Cluster analysis of pulsatility parameters for ghrelin and GH secretion is given on Table 2. Mean interpeak intervals and pulse frequencies were similar, but peak amplitudes were much more important for GH (574% over nadir) than for ghrelin (77%). Moreover, ghrelin secretion was quantitatively more irregular than that of GH, as indicated by ApEn (Fig. 7A).

Food intake episodes were more regular than ghrelin pulsatile variations but not significantly different from those of GH (Fig. 7A). Ghrelin concentrations were correlated with the duration of food intake, during the dark period only (Fig. 8), and plasma ghrelin concentrations decreased by 26% in the 20 min following the end of a food intake period (991 \pm

170 *vs.* 1338 \pm 222 pg/ml, $P = 0.0032$ paired *t* test) whatever the period of sampling. Total amount of GH secreted was also correlated with the duration of food intake ($r = 0.830$, $P < 0.05$). Cross-ApEn analysis revealed that GH/food intake and ghrelin/food intake rhythms were more synchronized than GH/ghrelin secretory patterns (Fig. 7B).

A positive correlation between ghrelin and active wake occurred during the first 3 h of the dark period ($r = 0.769$; $P = 0.0257$ between AUC ghrelin and duration of active wake), whereas no correlation between ghrelin or GH and any state of arousal was found.

Discussion

In rats, it was already known that exogenous ghrelin induces an immediate and marked increase in GH secretion and feeding behavior. We show herein that exogenous gh-

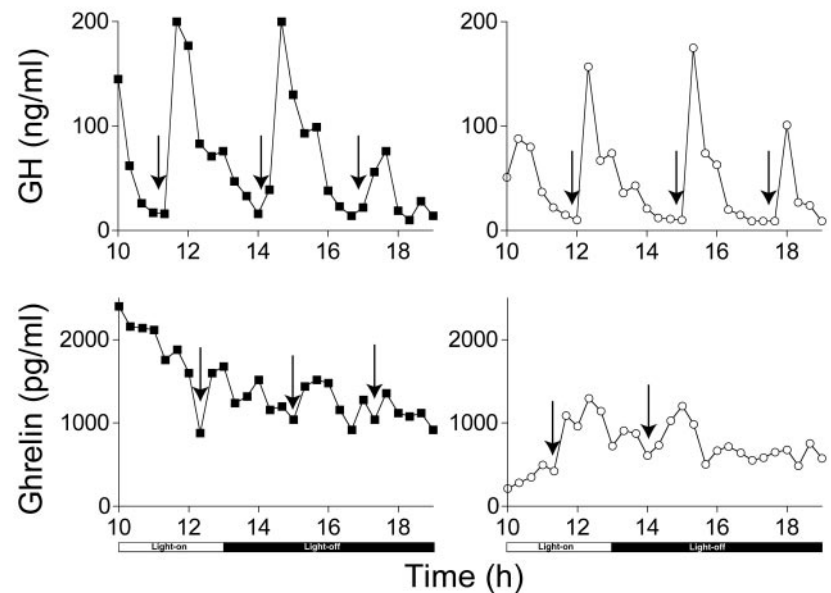


FIG. 5. Representative GH and ghrelin secretory patterns during a 9-h sampling period in two freely moving male rats. Arrows indicate the occurrence of peaks as defined by cluster analysis.

relins modifies sleep-wake pattern by increasing wakefulness and decreasing the duration of REM sleep periods. This might be caused either by a direct effect of ghrelin on sleep parameters or indirectly by the effects of the peptide on feeding behavior itself. Finally, and most interestingly, endogenous ghrelin secretion is pulsatile and directly related to feeding behavior but not to GH secretion and sleep-wake pattern.

As previously described (12), repeated administrations of ghrelin at 3- to 4-h intervals elicited an increase in GH release without desensitization. The immediate response is consistent with the estimated half-life of exogenous ghrelin (30 min in rat plasma) and with the fact that GHRH neurons would be activated after GH-secretagogues (33, 34) or ghrelin injection (35, 36), whereas SRIF neurons would be inhibited (12).

The constant observation of rat activity indicated an immediate modification in feeding behavior. The successive ghrelin injections corresponded to three different spontaneous states: at 1020 h, control rats do not eat; at 1420 h they have just eaten; and at 1720 h they are eating. In every instance, rats began searching for food immediately after ghrelin injection, then ate in the first 10 min following ghrelin administration and stopped from 30–50 min, depending on the light-dark period. Wren *et al.* (15) already reported an increase of ingested food 1 h after two ip injections of ghrelin separated of 4 h. The time-course of ghrelin effect on food intake is similar to that observed for ghrelin-induced GH release. Nevertheless, ghrelin effect on feeding seems independent of GH because Tschöp *et al.* (14) have shown that ghrelin induced a similar food intake increase in control and GH-deficient dwarf rats. Moreover, KP 102, a pharmacology designed GH secretagogue, is still effective on food ingestion after GHRH passive immunization (37), thus providing further evidence that ghrelin-induced food intake is independent from ghrelin-mediated GHRH release. The induction of food intake episodes by ghrelin injections, even when control animals were already engaged in normal feeding, suggests

that the mechanisms implicated in the orexigenic action of ghrelin are complementary to those of spontaneous food intake. Activation of NPY/AGRP neurons could be implicated in the induction of feeding behavior because NPY injection into the hypothalamus stimulates food intake (28). GHS-R receptors are present on these neurons (38) and ghrelin-induced feeding is inhibited by an anti-NPY IgG and an anti-AGRP IgG (39). Exogenous ghrelin could antagonize the negative effect of leptin on NPY/AGRP neurons, thereby increasing food intake, because ghrelin is able to block leptin-induced feeding reduction (40). Interestingly, the quantity of food ingested during the 9-h period observation was not different between treated and control animals as already described (40). This can be explained by a compensatory decrease of food intake in ghrelin-treated rats between the periods of stimulation. It cannot be excluded that ghrelin could induce a rapid craving for food followed by satiety.

The sleep-wake pattern was also modified by ghrelin injections. Wakefulness was only increased and SWS decreased when ghrelin was administered when rats were sleeping (at 1020 h mostly SWS and at 1420 h, a lot of REM sleep). When injected at 1720 h (rats are awake and eating), ghrelin was ineffective. Nevertheless, and as for food intake, on the 9-h period of monitoring, total wakefulness, and SWS durations were unchanged in the ghrelin-treated group. The immediate and temporary effect of ghrelin on wakefulness and SWS could be an indirect consequence of its orexigenic effect. In contrast, REM sleep decrease was observed on the 9 h of testing, suggesting that it is independent of the orexigenic effect of ghrelin. Ghrelin-induced GH or GHRH increases are probably not implicated because GH (41) and GHRH (42) induce REM sleep in rats. On the other hand, ghrelin inhibition of REM sleep would be compatible with its antagonistic function on SRIF activity because SRIF facilitates REM sleep in rats (43, 44). Microinjection of a SRIF antagonist in the locus coeruleus decreases REM sleep (45). During REM sleep, there is an inhibition of locus coeruleus neurons that may, at least in part, be due to SRIF release from fibers

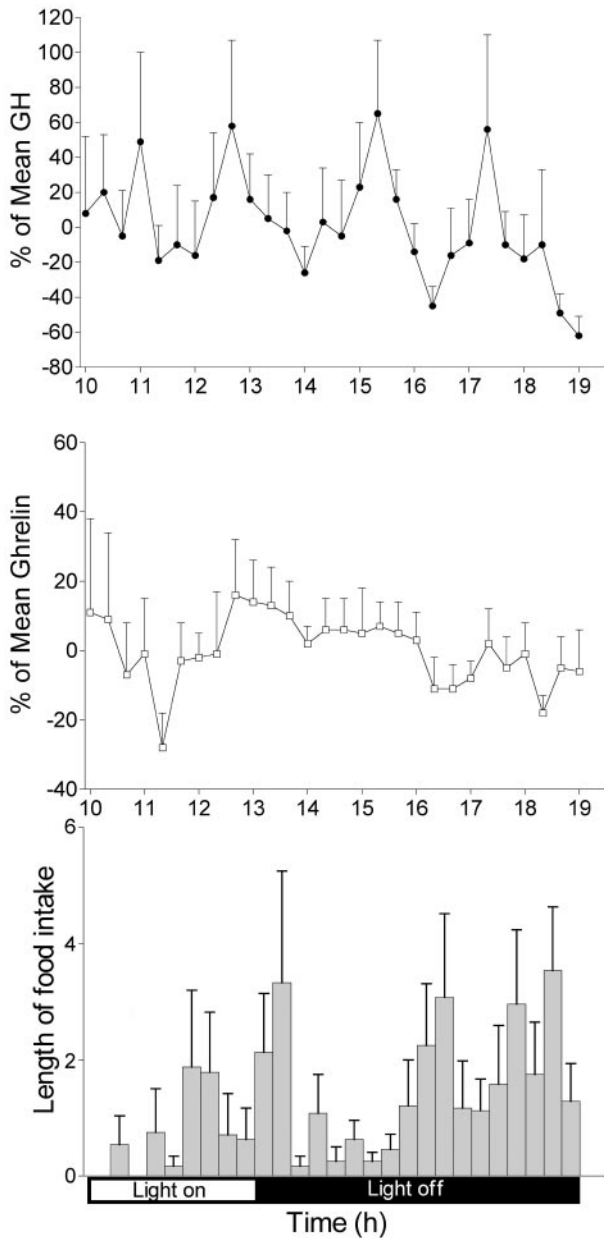


FIG. 6. Spontaneous patterns of GH secretion (*top panel*), ghrelin secretion (*middle panel*), and food intake (*bottom panel*). Mean 9-h profiles of GH and ghrelin levels, and of food intake were obtained on 8 rats. Hormonal data are represented as a percentage of the mean GH or ghrelin concentration for each animal. Values are mean \pm SEM.

originating in the hypothalamus (46–48). One might suggest that ghrelin, by reducing the inhibitory influence of SRIF, modifies the monoaminergic mechanisms that control REM sleep onset and duration. Finally, cholinergic neurons in the pontomesencephalic tegmental nuclei play an important role in REM sleep genesis. It is likely that SRIF facilitates REM sleep by increasing acetylcholine release by mesopontine tegmental neurons (49). Ghrelin might reduce acetylcholine release via its effect on SRIF transmission and, indirectly, alters REM sleep.

One of the main findings of the present study is the demonstration that ghrelin secretion is pulsatile and displays an

ultradian rhythmicity. Interestingly, the number of peak and the interval between peaks of ghrelin are similar to those observed for GH secretion, whereas peak amplitudes are much more important for GH. However, plasma ghrelin and GH levels are not strictly correlated, and cross-ApEn did not reveal a great synchronism between these two parameters. This result might have been expected because, based on hypophyseal portal rat blood sampling data, GHRH and SRIF fluctuations are also involved in this phenomenon (25, 26), with SRIF withdrawal being a prerequisite for GHRH action (50). It remains to be demonstrated directly, on rat portal blood measurements, whether ghrelin does inhibit SRIF release as already observed *in vitro* (12). In the sheep, only a minor and nonsignificant inhibition of SRIF portal levels was observed after iv injection of a synthetic GHS, hexarelin, whereas GHRH levels were markedly stimulated (34). On the other hand, a recent report even questions the role of GHRH in the generation of endogenous GH pulses in humans because GH secretion, though markedly diminished, is still pulsatile in patients with an inactivating defect of the GHRH receptor (51). So, a direct implication of endogenous ghrelin in the control of pulsatile GH release in the rat remains to be demonstrated. In that respect, it is noteworthy that rats presenting lower GH amplitudes also displayed lower ghrelin levels.

The positive correlation between the AUC of endogenous ghrelin levels and the duration of food intake episodes as well as the low X-ApEn value indicated that ghrelin and feeding behavior are closely linked. However, it is not clear whether endogenous ghrelin levels influence food intake or whether ghrelin levels are modified after a change in feeding activity. The decrease of food intake observed after intracerebroventricular administration of antighrelin IgG (39) does suggest that the endogenous peptide regulates feeding activity. Indeed, circulating ghrelin fell by 26% within the 20 min following the end of food intake and a comparable observation has been reported by Tschöp *et al.* (22) and Cummings *et al.* (52) in humans in which plasma ghrelin levels are decreased 2-fold within 1 h following each meal. Moreover, fasting increases plasma ghrelin levels (14), which are diminished in obese patients (23), some of whom even bearing mutations in the preproghrelin gene (53). Taken together, these data suggest that endogenous ghrelin influences food intake which in turn could modify ghrelin levels.

In our study on freely feeding undisturbed rats, correlation between endogenous ghrelin levels and sleep-wake pattern was only detected in the active wake during the first 3 h of the dark period. In previous studies, sleep-wake pattern, particularly REM sleep, and feeding activity were only related when the animals are put in drastic conditions such as food restriction and sleep deprivation (54). Indeed, when rats were food restricted during the light period, the diurnal distribution of REM sleep is reversed (55). Interestingly, the inhibitory effects of leptin on REM sleep are no more observed in rats food-deprived for 18 h (56). It remains to be determined whether plasma ghrelin levels would be modified in such conditions. Alternately, exogenous ghrelin injection always elicited an immediate and short lasting decrease in REM sleep, concomitant with the induction of feeding behavior. Thus, it might be hypothesized that the

TABLE 2. Cluster analysis of GH and ghrelin pulsatility parameters

	Mean levels (ng/ml)	Nadir (ng/ml)	Peak amplitude (ng/ml)	Peak frequency (no./540 min)	Peak interval (min)
GH	35.7 ± 6.3	14.7 ± 3.3	99.1 ± 20.7	2.3 ± 0.3	167 ± 22
Ghrelin	1.17 ± 0.27	1.09 ± 0.40	1.69 ± 0.48	2.7 ± 0.4	128 ± 18

Data are mean ± SEM of eight rats.

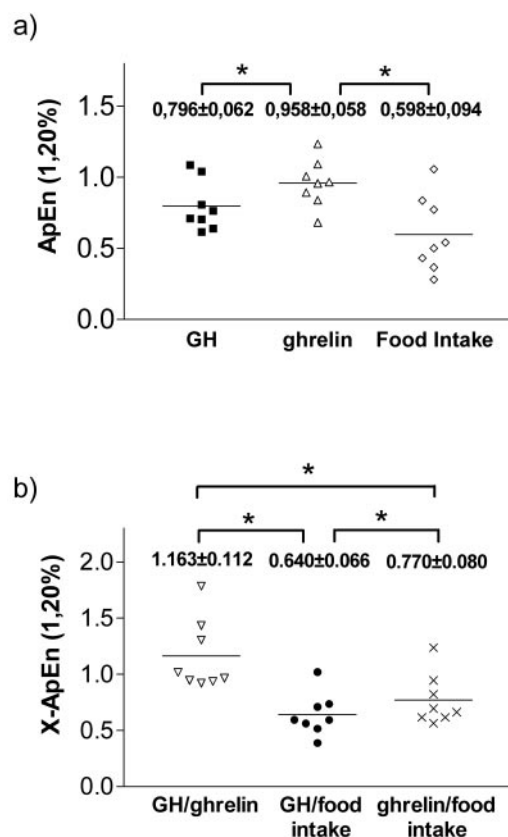


FIG. 7. ApEn (A) and X-ApEn (B) of GH, ghrelin, and food intake patterns. Higher ApEn and X-ApEn denote respectively greater irregularity and asynchrony of the rhythms. Numerical values are mean ± SEM of 8 rats. *, $P < 0.05$.

feeding behavior modification induced by exogenous ghrelin is related to a direct effect on REM sleep.

Sleep-wake pattern has also been related to GH ultradian rhythmicity in humans (27). Maximal GH release occurred within minutes of the onset of stage 3 or 4 sleep (57). In the adult male rat, conflicting results were reported. Original studies by Willoughby *et al.* (58) were negative, while other investigators found a definite correlation with each GH peak occurring with a consistent time lag 40–70 min after the onset of a sleep cycle (59). However, these studies did not differentiate between SWS and REM sleep episodes. A role of endogenous ghrelin in the regulation of REM sleep cannot be excluded but requires new investigations during longer recording periods.

In conclusion, ghrelin, in addition to affect GH secretion and feeding behavior, also modifies sleep-wake patterns. This last action is probably related to its effects on feeding behavior. Moreover, ghrelin secretion is pulsatile and directly correlated to feeding behavior only in accordance with its gastroprokinetic activity (13) and structural resemblance to motilin (2).

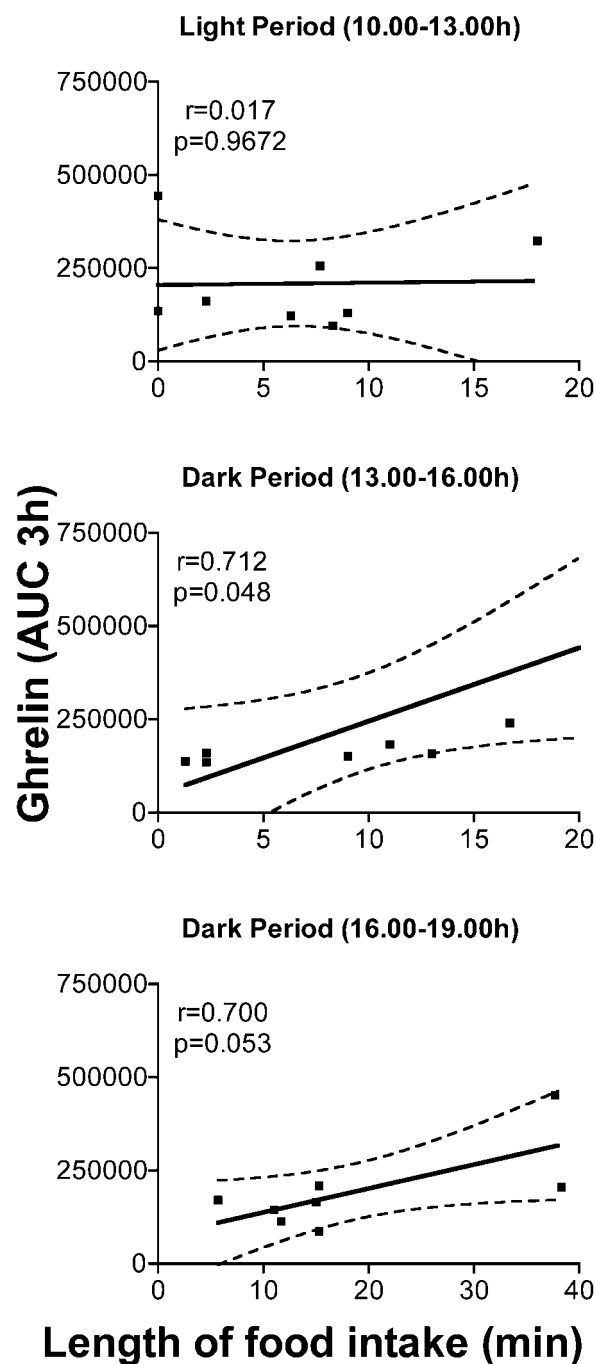


FIG. 8. Correlations between ghrelin and food intake during the light and dark periods. Ghrelin secretion is calculated as the area under the curve during each 3-h period (1000–1300 h = lights on; 1300–1600 and 1600–1900 h = dark periods). Correlation was still significant when the two dark periods were plotted together ($r = 0.784$, $P = 0.0212$), but it was no longer significant when the 9-h period was taken into account as a whole ($r = 0.656$, $P = 0.0771$).

Acknowledgments

We are grateful to the NIDDK for the provision of GH assay reagents, to P. Eberling for ghrelin synthesis, and to Drs. Veldhuis and Pincus for cluster and ApEn software, respectively.

Received October 22, 2001. Accepted December 4, 2001.

Address all correspondence and requests for reprints to: Jacques Epelbaum, U549 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut Fédératif de Recherche Broca-Sainte Anne, 2ter rue d'Alésia, 75014, Paris, France. E-mail: epelbaum@broca.inserm.fr.

This work was supported by INSERM.

References

- 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
- Tomasetto C, Karam SM, Ribieras S, Masson R, Lefebvre O, Staub A, Alexander G, Chenard MP, Rio MC 2000 Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: the motilin-related peptide. *Gastroenterology* 119:395–405
- Kagotani Y, Sakata I, Yamazaki M, Nakamura K, Hayashi Y, Kangawa K, Localization of ghrelin-immunopositive cells in the rat hypothalamus and gastrointestinal tract. Program of the 83rd Annual Meeting of The Endocrine Society, Denver, CO, 2001, p 337 (Abstract P2-203)
- Nass R, Hellmann P, Gaylinn B, Thorner MO, Measurement of ghrelin mRNA in stomach, pituitary and hypothalamus of young adult rats. Program of the 83rd Annual Meeting of The Endocrine Society, Denver, CO, 2001, p 327 (Abstract P2-159)
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CL, Hamelin M, Hreniuk DL, Palya 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, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH 1996 A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974–977
- Guan XM, Yu H, Palya OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD 1997 Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 48:23–29
- Bennett PA, Thomas GB, Howard AD, Feighner SD, van der Ploeg LH, Smith RG, Robinson IC 1997 Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology* 138:4552–4557
- Muccioli G, Ghe C, Ghigo MC, Papotti M, Arvat E, Boghen MF, Nilsson MH, Deghenghi R, Ong H, Ghigo E 1998 Specific receptors for synthetic GH secretagogues in the human brain and pituitary gland. *J Endocrinol* 157:99–106
- Skinner MM, Nass R, Lopes B, Laws ER, Thorner MO 1998 Growth hormone secretagogue receptor expression in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4314–4320
- Adams EF, Huang B, Buchfelder M, Howard A, Smith RG, Feighner SD, van der Ploeg LH, Bowers CY, Fahlbusch R 1998 Presence of growth hormone secretagogue receptor messenger ribonucleic acid in human pituitary tumors and rat GH3 cells. *J Clin Endocrinol Metab* 83:638–642
- Seoane LM, Tovar S, Baldelli R, Arvat E, Ghigo E, Casanueva FF, Dieguez C 2000 Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats. *Eur J Endocrinol* 143:R007–R009
- Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, Rio MC, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT 2001 *In vivo* and *in vitro* effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 73:54–61
- Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K 2000 Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 276:905–908
- Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML 2000 Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908–913
- Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR 2000 The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141:4325–4328
- Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiyama M, Niiijima A, Fujino MA, Kasuga M 2001 Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120:337–345
- Peino R, Baldelli R, Rodriguez-Garcia J, Rodriguez-Segade S, Kojima M, Kangawa K, Arvat E, Ghigo E, Dieguez C, Casanueva FF 2000 Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *Eur J Endocrinol* 143:R11–R14
- 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 (GH) release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4908–4911
- 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* 86:1169–11674
- 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–R1487
- Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S 2001 Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* 281:1220–1225
- Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C 2001 Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24:RC19–RC21
- Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML 2001 Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50:707–709
- Bowers CY 2001 Unnatural growth hormone-releasing peptide begets natural ghrelin. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1464–1469
- Robinson IC, Hindmarsh PC 1999 The growth hormone secretory pattern and natural growth. In: Kosryo JL, Goodman HM, eds. *Handbook of physiology*. 7th section, vol 5. New York: Wiley; 329–395
- Giustina A, Veldhuis JD 1998 Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev* 19:717–797
- Van Cauter E, Copinschi G 2000 Interrelationships between growth hormone and sleep. *Growth Hormone IGF Res* 10:57–62
- Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF 1986 Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7:1189–1192
- Bluet-Pajot MT, Durand D, Drouva SV, Mounier F, Pressac M, Kordon C 1986 Further evidence that thyrotropin-releasing hormone participate in the regulation of growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 44:70–75
- Ezan E, Laplante E, Bluet-Pajot MT, Mounier F, Mamas S, Grouselle D, Grognet JM, Kordon C 1997 An enzyme immunoassay for rat growth hormone: validation and application to the determination of plasma levels and *in vitro* release. *J Immunoassay* 18:335–356
- Veldhuis JD, Johnson ML 1986 Cluster analysis: a simple, versatile, and robust algorithm for endocrine pulse detection. *Am J Physiol* 250:E486–E493
- Pincus SM 2000 Irregularity and asynchrony in biologic network signals. *Methods Enzymol* 321:149–182
- Clark RG, Carlsson LMS, Trojnar J, Robinson IC 1989 The effects of a growth hormone-releasing peptide and growth hormone-releasing factor in conscious and anesthetized rats. *J Neuroendocrinol* 1:249–255
- Guillaume V, Magnan E, Cataldi M, Doutour A, Sauze N, Renard M, Razafindraibe H, Conte-Devolx B, Deghenghi R, Lenaerts V, Oliver C 1994 Growth hormone (GH)-releasing hormone secretion is stimulated by a new GH-releasing hexapeptide in sheep. *Endocrinology* 135:1073–1076
- Date Y, Murakami N, Kojima M, Date Y, Mondal MS, Kojima M, Yoshimatsu H, Kangawa K, Matsukura S 2000 Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 275:477–480
- Gurd W, Parent G, Eniojukan R, Bowers CY, Tannenbaum GS, Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/GHRH in regulation of pulsatile GH secretion. Program of the 83rd Annual Meeting of The Endocrine Society, Denver, CO, 2001, p 72 (Abstract OR 3-5)
- Okada K, Ishii S, Minami S, Sugihara H, Shibasaki T, Wakabayashi I 1996 Intracerebroventricular administration of the growth hormone-releasing peptide KP-102 increases food intake in free-feeding rats. *Endocrinology* 137:5155–5158
- Willens MG, Kristensen P, Romer J 1999 Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70:306–316
- 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
- Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyayama 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
- Drucker-Colin RR, Spanis CW, Hunyadi J, Sassini JF, McLaughlin JL 1975 Growth hormone effects on sleep and wakefulness in the rat. *Neuroendocrinology* 18:1–8
- Obal Jr F, Payne L, Opp M, Alfoldi P, Kapas L, Krueger JM 1992 Growth hormone-releasing hormone antibodies suppress sleep and prevent enhancement of sleep after sleep deprivation. *Am J Physiol* 263:R1078–R1085
- Dangour J, De Saint-Hilaire-Kafi S 1988 Somatostatin antiserum blocks carbachol-induced increase of paradoxical sleep in the rat. *Brain Res Bull* 20:9–12

44. Beranek L, Obal Jr F, Taishi P, Bodosi B, Laczi F, Krueger JM 1997 Changes in rat sleep after single and repeated injections of the long-acting somatostatin analog octreotide. *Am J Physiol* 273:R1484–R1491
45. Toppila J, Niittymäki P, Porkka-Heiskanen T, Stenberg D 2000 Intracerebroventricular and locus coeruleus microinjections of somatostatin antagonist decrease REM sleep in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 66:721–727
46. Perez J, Rigo M, Kaupmann K, Bruns C, Yasuda K, Bell GI, Lubbert H, Hoyer D 1994 Localization of somatostatin (SRIF) SSTR-1, SSTR-2 and SSTR-3 receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 349:145–160
47. Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvet M 1995 Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *Neuroscience* 65:119–160
48. Mounier F, Bluet-Pajot MT, Moinard F, Kordon C, Epelbaum J 1996 Activation of locus coeruleus somatostatin receptors induces an increase of growth hormone release in male rats. *J Neuroendocrinol* 8:761–764
49. Mancillas JR, Siggins GR, Bloom FE 1986 Somatostatin selectively enhances acetylcholine-induced excitations in rat hippocampus and cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7518–7521
50. Tannenbaum GS, Ling N 1984 The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology* 115:1952–1957
51. Roelfsema F, Biermasz NR, Veldman RG, Veldhuis JD, Frolich M, Stokvis-Brantsma WH, Wit JM 2001 Growth hormone (GH) secretion in patients with an inactivating defect of the GH-releasing hormone (GHRH) receptor is pulsatile: evidence for a role for non-GHRH inputs into the generation of GH pulses. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2459–2464
52. 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
53. Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Snyder EE, Chagnon M, Sjostrom L, Bouchard C 2001 Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3996–3999
54. Johansson GG, Elomaa E 1986 Effects of partial food restriction on nocturnal meal size and feeding speed are counteracted by concurrent REM sleep deprivation in the rat. *Behav Brain Res* 20:275–280
55. Roky R, Kapas L, Taishi TP, Fang J, Krueger JM 1999 Food restriction alters the diurnal distribution of sleep in rats. *Physiol Behav* 67:697–703
56. Sinton CM, Fitch TE, Gershenfeld HK 1999 The effects of leptin on REM sleep and slow wave δ in rats are reversed by food deprivation. *J Sleep Res* 8:197–203
57. Holl RW, Hartman ML, Veldhuis JD, Taylor WM, Thorner MO 1991 Thirty-second sampling of plasma growth hormone in man: correlation with sleep stages. *J Clin Endocrinol Metab* 72:854–861
58. Willoughby JO, Martin JB, Renaud LP, Brazeau P 1976 Pulsatile growth hormone release in the rat: failure to demonstrate a correlation with sleep phases. *Endocrinology* 98:991–996
59. Kimura F, Tsai CW 1984 Ultradian rhythm of growth hormone secretion and sleep in the adult male rat. *J Physiol* 353:305–315

Article 2 : Zizzari P, Halem H, Taylor J, Dong JZ, Datta R, Culler MD, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. Endogenous ghrelin regulates episodic growth hormone (GH) secretion by amplifying GH Pulse amplitude: evidence from antagonism of the GH secretagogue-R1a receptor. *Endocrinology*. 2005 Sep;146(9):3836-42

Endogenous Ghrelin Regulates Episodic Growth Hormone (GH) Secretion by Amplifying GH Pulse Amplitude: Evidence from Antagonism of the GH Secretagogue-R1a Receptor

P. Zizzari, H. Halem, J. Taylor, J. Z. Dong, R. Datta, M. D. Culler, J. Epelbaum, and M. T. Bluet-Pajot

Unité Mixte de Recherche 549 (P.Z., J.E., M.T.B.-P.), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Paris 5, 75014 Paris, France; and IPSEN (H.H., J.T., J.Z.D., R.D., M.D.C.), Milford, Massachusetts 01757

Ghrelin was purified from rat stomach as an endogenous ligand for the GH secretagogue (GHS) receptor. As a GHS, ghrelin stimulates GH release, but it also has additional activities, including stimulation of appetite and weight gain. Plasma GH and ghrelin secretory patterns appear unrelated, whereas many studies have correlated ghrelin variations with food intake episodes. To evaluate the role of endogenous ghrelin, GH secretion and food intake were monitored in male rats infused sc (6 $\mu\text{g/h}$ during 10 h) or intracerebroventricularly (5 $\mu\text{g/h}$ during 48 h) with BIM-28163, a full competitive antagonist of the GHS-R1a receptor. Subcutaneous BIM-28163 infusion significantly decreased GH area under the curve during a 6-h sampling period by 54% and peak amplitude by 46%. Twelve hours after the end of treatment these parameters returned to normal. Central treatment was similarly effective

(–37 and –42% for area under the curve and –44 and –49% for peak amplitude on the first and second days of infusion, respectively). Neither peripheral nor central BIM-28163 injection modified GH peak number, GH nadir, or IGF-I levels. In this protocol, food intake is not strongly modified and water intake is unchanged. Subcutaneous infusion of BIM-28163 did not change plasma leptin and insulin levels evaluated at 1200 and 1600 h. On the contrary, central BIM-28163 infusion slightly increased leptin and significantly increased insulin concentrations. Thus, endogenous ghrelin, through GHS-R1a, acts as a strong endogenous amplifier of spontaneous GH peak amplitude. The mechanisms by which ghrelin modifies food intake remain to be defined and may involve a novel GHS receptor. (*Endocrinology* 146: 3836–3842, 2005)

THE SECRETORY PATTERN of GH is mainly driven by two counterregulatory neurohormones, GHRH and somatostatin. However, the existence of a third factor regulating GH rhythmicity was suggested 20 yr ago when met-enkephalin analogs without opiate-like activity were found to exert potent GH-releasing activity (1). Since then, numerous synthetic GH secretagogues (GHS) have been developed and shown to act through a specific G protein-coupled receptor, GHS-R1a (2). GHS-R1a is distinct from the GHRH receptor and is mainly expressed in the hypothalamus and pituitary gland. In 1999, a 28-amino-acid acylated peptide was identified as an endogenous ligand for the GHS-R1a and termed ghrelin (3). It has been demonstrated that the acylation is essential for GHS-R1a binding. Ghrelin is produced mainly by A-like cells in oxyntic glands of the stomach, and it is secreted into the bloodstream (4). In addition to the gastrointestinal tract, ghrelin expression, at either the mRNA or protein level or both, has been identified in a number of tissues, including the hypothalamus (5). In this brain structure, low levels of ghrelin have been measured in the arcuate nucleus (3, 6), which is involved in the control of GH secretion and food intake. As expected, ghrelin stimulates GH

release (3, 4, 7–9) but also exerts multiple activities, including increased feeding (9) and weight gain (10). The circulating levels and patterns of ghrelin and GH appear weakly related (11), whereas many studies have established strong correlations between ghrelin variations and food intake episodes. Fasting increases circulating ghrelin levels, which decrease after food intake (11–13). Ghrelin gene deletion in mice impairs neither growth nor appetite (14, 15), although deleting the GHS-R gene does abolish both ghrelin and synthetic GHS effects on these two functions (16). Thus, the role of endogenous ghrelin in the regulation of pulsatile GH secretion and food intake is not yet clear. The aim of the present study was to define this role by examining the effects of treating rats with a novel analog of ghrelin, BIM-28163, recently developed as a full competitive antagonist of the GHS-R1a (17).

Materials and Methods

In vitro experiments

Binding assay. The cDNA of the human GHS-R1a was cloned by PCR using human brain RNA (Clontech, Palo Alto, CA) as the template. The PCR product was cloned into the pCR2.1 vector using the TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) and subcloned into the mammalian expression vector pcDNA 3.1 (Invitrogen). The plasmid was transfected into the Chinese hamster ovary cell line, CHO-K1 (American Type Culture Collection, Manassas, VA), by the calcium phosphate method. Single-cell clones stably expressing the human GHS-R1a were obtained by selecting transfected cells using 0.8 mg/ml G418-containing selection media (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Membranes were prepared for radioligand binding studies by homogenization of CHO-K1 cells expressing the human recombinant GHS-

First Published Online May 26, 2005

Abbreviations: AUC, Area under the curve; GHS, GH secretagogue; GHS-R, GHS receptor; icv, intracerebroventricular.

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

R1a in 20 ml of ice-cold 50 mM Tris-HCl with a Brinkmann Polytron (Westbury, NY) (setting 6, 15 sec). The homogenates were washed twice by centrifugation ($39,000 \times g$ for 10 min), and the final pellets were resuspended in 50 mM Tris-HCl, containing 2.5 mM $MgCl_2$ and 0.1% BSA. For assay, aliquots (0.4 ml) were incubated with 0.05 nM [^{125}I]hghrelin (~ 2000 Ci/mmol), with and without 0.05 ml of unlabeled competing test peptide. After a 60-min incubation (4 C), the bound [^{125}I]hghrelin was separated from the free by rapid filtration through GF/C filters (Brandel, Gaithersburg, MD), which had been previously soaked in 0.5% polyethyleneimine/0.1% BSA. The filters were then washed three times with 5-ml aliquots of ice-cold 50 mM Tris-HCl and 0.1% BSA, and the bound radioactivity trapped on the filters was counted by γ -spectrometry (Wallac LKB, Gaithersburg, MD). Specific binding was defined as the total [^{125}I]hghrelin bound minus that bound in the presence of 1000 nM unlabeled hghrelin (Bachem, Torrance, CA).

Intracellular calcium mobilization assay. CHO-K1 cells, expressing the GHS-R1a, were harvested by incubating in a 0.3% EDTA/PBS solution (25 C) and washed twice by centrifugation. The washed cells were resuspended in Hanks' buffered saline solution for loading of the fluorescent calcium indicator fura-2AM. Cell suspensions of approximately 10^6 cells/ml were incubated with 2 mM fura-2AM for 30 min at 25 C. Unloaded fura-2AM was removed by centrifugation twice in Hanks' buffered saline solution, and the final suspensions were transferred to a spectrofluorometer (Hitachi F-2000) equipped with a magnetic stirring mechanism and a temperature-regulated cuvette holder. After equilibration to 37 C, the hghrelin analogs were added for measurement of intracellular calcium mobilization. The excitation and emission wavelengths were 340 and 510 nm, respectively.

In vivo experiments

Acute in vivo GH stimulation. Male Sprague-Dawley rats (250 g) were anesthetized and fit with a jugular-right atrial cannula 18 h before the experiment. To determine basal hormone levels, blood samples were withdrawn into heparinized syringes at time -10 and 0 min. To demonstrate antagonist activity, immediately after the time 0 blood sample, the rats were injected with either BIM-28163 (1000 $\mu g/kg$) or vehicle via the indwelling cannula. Ten minutes later, a blood sample was withdrawn, and the rats were immediately injected with either hghrelin (10 $\mu g/kg$) or vehicle via the cannula. Subsequent blood samples were withdrawn 10, 20, and 40 min after injection of hghrelin or vehicle. Plasma was separated and stored until assay for GH.

Chronic in vivo treatments. Four weeks before sampling experiments, adult male Sprague-Dawley rats weighing 100–125 g (Charles River Laboratories, Inc., L'Arbresle, France) were housed individually in transparent plastic containers placed in a soundproof room with controlled temperature (22–24 C) and illumination (12 h light, 12 h dark schedule with lights off at 1900 h). They had free access to food and water and were regularly handled and weighed to minimize stress effects. Guidelines of the National Institute of Health for the Care and Use of Laboratory Animals were followed.

Subcutaneous treatment. Six days before the experiment, an osmotic minipump (Alzet model 2002, flow rate 0.5 $\mu l/h$ for 14 d) (Charles River) was connected to a polyethylene catheter and implanted sc in the back of the animals under ether anesthesia. The catheter had previously been filled with a combination of saline and BIM or saline. This resulted in delivery of saline during 144 h followed by BIM-28163 (6 $\mu g/h$) or saline during 10 h. On the day of the experiment (d 0), sc treatment started at 0900 h, and rats received ip injection of 300 $\mu g/0.2$ ml BIM-28163 or 0.2 ml NaCl at 1000 h.

Intracerebroventricular (icv) treatment. Six days before the experiment, a chronic icv cannula (Alzet Brain Infusion Kit II; Charles River) was inserted into the lateral ventricle of the brain under pentobarbital anesthesia (60 mg/kg of body weight ip; Centravet, Plancoet, France). The following coordinates were used: anterior -0.8 mm to the bregma; lateral -1.5 mm to the midline; height -3.8 mm to the bregma, with the incisor bar set at -3.3 mm below the interaural line. The cannula was secured to the skull of the animal with stainless steel and dental cement and connected to an osmotic minipump (Alzet model 2002; flow rate, 0.5 $\mu l/h$ for 14 d) (Charles River) implanted under the dorsal skin of the

animal. The flow moderator of the pump was connected to the polyethylene catheter containing 72 μl saline, which was administered during the first 6 d in all animals. A small air bubble was inserted to separate the saline solution from an additional 24 μl BIM-28163 (5 $\mu g/h$) or saline to be delivered for an additional 48 h. Treatment started at 0800 h on d 0 until 0800 h on d 2.

Blood sampling schedule

Experiments were performed on freely moving rats. Two days before data collection, an indwelling cannula was inserted into the right atrium under ether anesthesia as previously described (18). Two hours before the sampling and recording period, the distal extremity of the cannula was connected to a polyethylene catheter filled with 25 IU/ml heparinized saline. Blood samples were withdrawn every 20 min and centrifuged immediately. Red blood cells were resuspended in saline and reinjected every hour to attenuate hemodynamic modifications. Plasma was stored at -20 C until assayed for GH.

Feeding behavior

Experiments on food and water intake were performed on a separate group of animals that underwent the same treatments. Food and water intake were measured continuously with a PC-controlled monitoring system (feeding/drinking monitor; Technical and Scientific Equipment, Bad Homburg, Germany). Animals were acclimated to this new environment for 1 wk before actual monitoring.

Hormonal determinations

Plasma GH concentrations were measured by enzyme immunoassay as previously described (19). Values are reported in terms of rGH-RP2, with sensitivity of 5 ng/ml and intra- and interassay coefficients of variation less than 7%.

Plasma insulin, total leptin, and IGF-I levels were determined with RIA kits following manufacturer instructions (Linco, Saint Charles, MO, and DSL, Webster, TX, respectively). The sensitivity was 0.2, 0.5, and 160 ng/ml, respectively. For all assays, the intra- and interassay coefficients of variation were less than 10%.

Statistical analysis

GH pulse analysis was performed using the Cluster program (20) with the t value set to 2 to maintain false positive rates under 1%. Cluster size was set to two prepeak and two postpeak nadir values. False positive error for peak detection was 7%.

Areas under the GH response curves (AUC) were calculated by mean of trapezoidal analysis.

Values are given as means \pm SEM, and statistical analysis was performed by ANOVA and paired t test using the JMP IN 5.1 software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Results

In vitro experiments

BIM-28163 was found to displace labeled hghrelin binding to the human GHS-R1a with an IC_{50} (Ki) of 8.1 ± 1.3 nM. Human ghrelin, under the same conditions, had an IC_{50} of 1.6 ± 0.3 nM.

In the calcium mobilization assay, hghrelin induced concentration-dependent calcium mobilization in cells stably transfected with the human GHS-R1a between the concentrations of 0.1 and 100 nM, with an EC_{50} of 5.4 ± 1.4 nM. In contrast, BIM-28163 had no effect on calcium mobilization, even when tested at concentrations as high as 10^{-6} M (data not shown). When added in combination, BIM-28163 attenuated the ability of hghrelin to induce calcium mobilization in a dose-dependent manner, with complete inhibition achieved with a ratio of 100:1 BIM-28163:hghrelin (Fig. 1),

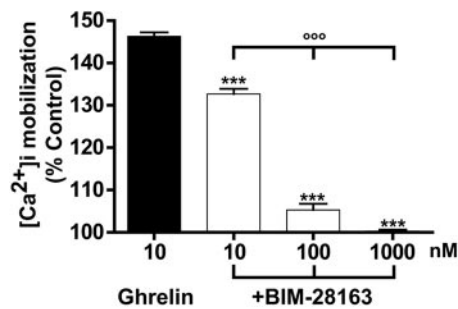


FIG. 1. Dose-related attenuation of the ability of h-ghrelin to stimulate calcium mobilization in CHO-K1 cells stably transfected with the human GHS-R1a by BIM-28163, a competitive, though nonactivating, ligand for GHS-R1a. Each bar and bracket represents the mean \pm SEM of three replicate experiments. ***, $P < 0.001$ vs. ghrelin; ooo, $P < 0.001$.

indicating that BIM-28163 acts as a full, competitive antagonist of ghrelin at the GHS-R1a.

Neither [¹²⁵I]h-ghrelin binding nor ghrelin-induced mobilization of intracellular calcium was observed in the parent CHO-K1 cell line.

In vivo experiments

Acute *in vivo* GH stimulation. Ghrelin-induced GH stimulation was maximal 10 min after injection (data not shown). As illustrated on Fig. 2, injection of h-ghrelin (10 μ g/kg) alone into freely moving, unanesthetized rats induced a significant increase in plasma GH, whereas injection of BIM-28163 (1000 μ g/kg) was without effect. When BIM-28163 was injected 10 min before h-ghrelin, the h-ghrelin-induced increase in GH secretion was completely abolished.

Chronic *in vivo* treatments. BIM-28163 was infused either sc (at the rate of 6 μ g/h during 10 h after an ip bolus of 300 μ g) or icv (at the rate of 5 μ g/h during 48 h) to unanesthetized, freely moving rats, and blood samples were collected every 20 min for 6 h the first day, 1 h after the beginning of infusion, and the following day during the same period. Individual profiles are illustrated on Fig. 3. BIM-28163 administration always resulted in a rapid decrease in spontaneous GH re-

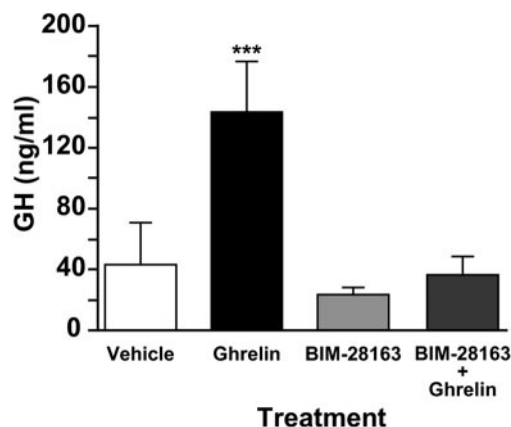


FIG. 2. Acute blockade by BIM-28163 of h-ghrelin stimulation of GH secretion *in vivo*. Data are presented as peak GH levels observed 10 min after the injection of vehicle, h-ghrelin (10 μ g/kg), BIM-28163 (1000 μ g/kg), or the combination. ***, $P < 0.001$ vs. vehicle.

lease. Throughout BIM-28163 treatment, total GH, calculated as AUC, was significantly lower in treated animals compared with their respective controls (Table 1). The decrease in total GH corresponded to a similar decrease in GH peak amplitudes. Basal values and GH pulse number were not modified (Table 1). The icv infusion was similarly effective on the first and second day of treatment. Fifteen hours after the end of sc treatment, pulsatile GH secretion was similar to that of controls.

Neither sc nor icv treatment modified plasma IGF-I levels, sampled at 1500 h [sc treatment: BIM-28163, 779 \pm 84 ng/ml ($n = 5$), vs. saline, 855 \pm 78 ng/ml; icv treatment: BIM-28163, 977 \pm 94 ng/ml ($n = 7$), vs. saline, 1105 \pm 133 ng/ml ($n = 7$), on the first day, and BIM-28163, 1199 \pm 96 ng/ml ($n = 7$), vs. saline, 1162 \pm 113 ng/ml ($n = 7$), on the second day].

The sc infusion of BIM-28163 changed neither plasma leptin nor insulin levels evaluated at 1200 and 1600 h. In contrast, icv BIM-28163 infusion slightly increased leptin and significantly increased insulin concentrations (Table 2).

Food intake was modestly increased only during the lights-on period on the second day after icv infusion of BIM-28163 (Fig. 4), and water consumption remained unchanged after either peripheral or central BIM-28163 infusion.

Discussion

In this study, either sc or icv infusion of a GHS-R1a antagonist, BIM-28163, was demonstrated to decrease spontaneous GH secretion without causing major changes in food intake. This h-ghrelin analog is a full competitive antagonist at the GHS-R1a. Indeed, BIM-28163 binds to the h-GHS-R1a receptor and can displace h-ghrelin binding, but BIM-28163 does not activate GHS-R1a and completely and dose-dependently inhibits the ability of ghrelin to stimulate calcium mobilization in h-GHS-R1a-transfected cells and GH secretion *in vivo*. Moreover, BIM-28163 blunts the GH-releasing effect of ghrelin but not the GHRH-induced GH rise (17). Thus, our results indicate that ghrelin, acting through the GHS-R1a, appears to be an endogenous regulator of spontaneous GH secretion but not necessarily of food intake.

Interestingly, antagonism of the GHS-R1a in freely moving male rats does not impair the pulsatile pattern of GH secretion; however, it significantly lowers pulse amplitude. These results suggest that endogenous ghrelin acts to amplify the basic pulsatile pattern of GH established by the interplay of hypothalamic GHRH and somatostatin (21). Indeed, it has been established that concomitant administration of ghrelin and GHRH produces an increase in GH secretion significantly greater than that induced by either factor alone (22). The observation that antagonism of the GHS-R1a receptor with BIM-28163 lowers spontaneous GH pulse amplitude and total GH secretion without altering the basic pulsatile pattern agrees well with the observation of Chapman *et al.* (23) that treatment of elderly men with MK677, a nonpeptide ligand and agonist of the GHS-R1a, results in a significant increase in GH secretion without changing the underlying pulsatile pattern. Previously, repetitive injections of [D-Lys₃]-GHRP6, a compound reported to be a GHS-R1a antagonist, did not significantly reduce plasma GH levels (24); however, a very low dose of [D-Lys₃]-GHRP6 was used (750 ng, less

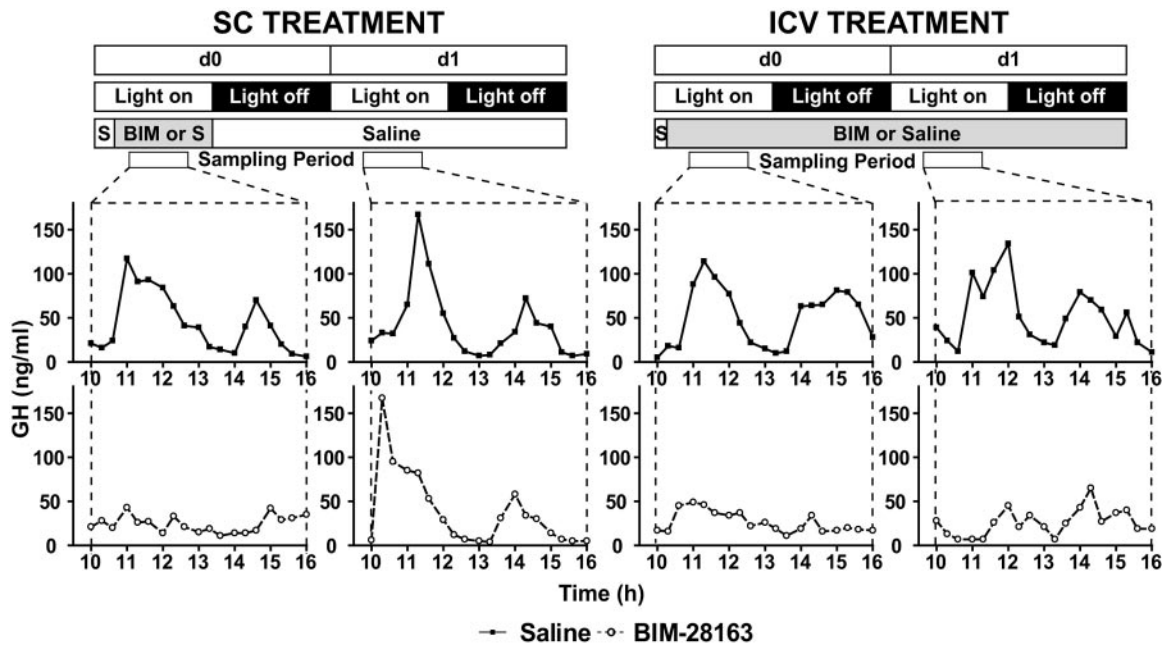


FIG. 3. Representative GH secretory patterns during a 6-h sampling period in freely moving male rats that received subchronic sc (left) or icv (right) administration of either BIM-28163 (○) or saline (■). In the sc group, rats were infused at d 0 with saline or BIM-28163 (6 $\mu\text{g}/\text{h}$) from 0900–1900 h and received an ip injection of saline or BIM-28163 (300 μg) at 1000 h. In the icv group, rats were infused with saline or BIM-28163 (5 $\mu\text{g}/\text{h}$) for 48 h from 0800 h at d 0. Blood samples were collected every 20 min.

than 1 nmol) considering the *in vitro* IC_{50} (3.2×10^{-6} M) of this particular analog (25) and its minimum effective dose on *in vivo* food intake (200 nm) (26). On the other hand, GH secretion was reduced in female (but not in male) transgenic rats expressing an antisense GHS-R mRNA under the control of the tyrosine hydroxylase promoter, thus selectively attenuating GHS-R protein expression in the arcuate nucleus (27). Moreover, in *ghsr*-null mice, serum IGF-I levels and body weight are reduced compared with wild-type littermates, suggesting decreased GH secretion (16). Taken together, these data suggest that endogenous ghrelin (or another, yet unidentified, ligand of GHS-R1a) acts as an amplifier of GH pulsatility. At the present time, a strict correlation has not been established between GH and ghrelin secretory episodes (11); however, only total ghrelin was monitored, and it cannot be excluded that a stronger correlation occurs between GH and acylated ghrelin, which represents only a minor proportion of total plasma ghrelin and has a very short half-life (28).

In the subchronic experimental paradigm used herein, total plasma IGF-I levels were not modified by BIM-28163 infusion. This lack of effect is in keeping with the data obtained on male transgenic rats expressing an antisense GHS-R mRNA in the arcuate nucleus (27) as well as another study in which chronic icv administration of ghrelin for 7 d did not affect IGF-I levels (29). Moreover, 95% of IGFs circulate bound to IGF binding proteins and have a half-life of 12–15 h (30, 31); thus, it cannot be excluded that a longer treatment might affect IGF-I levels.

Interestingly, plasma leptin slightly and insulin concentrations were significantly elevated by icv BIM-28163 treatment but not by peripheral administration. The change in plasma leptin concentrations may represent triggering of counterregulatory mechanisms because leptin has been reported to suppress feeding, although the overt effect of ghrelin on feeding in the present study was minimal. Surprisingly, the effect on insulin secretion was observed only after icv administration of BIM-28163. Expression of the GHS-R1a

TABLE 1. Cluster analysis of GH pulsatility parameters in BIM-28163-treated rats

Route of administration	Sampling day	Treatment	AUC	Number of peaks	Peak amplitude (ng/ml)	Nadir (ng/ml)
sc	0	Saline (n = 7)	12863 \pm 1467	1.7 \pm 0.2	69 \pm 11	23 \pm 1
		BIM-28163 (n = 7)	5948 \pm 1320 ^a	1.7 \pm 0.7	37 \pm 6 ^b	24 \pm 7
	1	Saline (n = 7)	16617 \pm 1174	2.5 \pm 0.5	101 \pm 13	26 \pm 4
		BIM-28163 (n = 6)	13958 \pm 2114	2.6 \pm 0.5	81 \pm 9	23 \pm 4
icv	0	Saline (n = 7)	13085 \pm 1435	2.0 \pm 0.4	70 \pm 10	23 \pm 1
		BIM-28163 (n = 7)	8235 \pm 1163 ^b	1.6 \pm 0.5	38 \pm 5 ^b	21 \pm 2
	1	Saline (n = 7)	18681 \pm 1497	3.0 \pm 0.5	114 \pm 11	31 \pm 5
		BIM-28163 (n = 5)	10926 \pm 489 ^a	2.2 \pm 0.2	59 \pm 3 ^a	19 \pm 1

In the sc group, rats were infused at d 0 with saline or BIM-28163 (6 $\mu\text{g}/\text{h}$) from 0900–1900 h and received an injection of saline or BIM-28163 (300 μg) at 1000 h. In the icv group, rats were infused with saline or BIM-28163 (5 $\mu\text{g}/\text{h}$) for 48 h from 0800 h at d 0. Data are mean \pm SEM.

^a $P < 0.01$ vs. saline.

^b $P < 0.05$ vs. saline.

TABLE 2. Effect of subchronic BIM-28163 administration on insulin and leptin plasma levels

Route of administration	Sampling day	Treatment	Insulin (ng/ml)		Leptin (ng/ml)	
			1200 h	1600 h	1200 h	1600 h
sc	0	Saline (n = 5)	1.53 ± 0.09	1.77 ± 0.08	4.56 ± 0.27	3.48 ± 0.40
		BIM-28163 (n = 5)	1.78 ± 0.23	1.90 ± 0.24	4.89 ± 0.66	3.78 ± 0.86
	1	Saline (n = 5)	1.83 ± 0.13	1.30 ± 0.10	3.72 ± 0.31	2.60 ± 0.25
		BIM-28163 (n = 5)	1.65 ± 0.12	1.81 ± 0.08	3.94 ± 0.66	2.88 ± 0.35
icv	0	Saline (n = 7)	1.76 ± 0.22	2.02 ± 0.23	3.74 ± 0.34	3.31 ± 0.24
		BIM-28163 (n = 7)	2.70 ± 0.35 ^b	3.07 ± 0.32 ^a	4.56 ± 0.24	4.10 ± 0.36
	1	Saline (n = 7)	1.92 ± 0.26	2.27 ± 0.34	3.56 ± 0.23	2.61 ± 0.16
		BIM-28163 (n = 5)	2.86 ± 0.46 ^b	3.17 ± 0.70	4.78 ± 0.69	3.60 ± 0.64

For sc administration, hormones were measured in freely moving male rats at 1200 and 1600 h on d 0 (3 and 7 h after the start of the treatment) and at the same time on d 1 (17 and 21 h after the end of the treatment). For icv administration, hormones were measured in freely moving male rats at 1200 and 1600 h on d 0 (4 and 8 h after the start of the treatment) and at the same time on d 1 (28 and 32 h after the start of the treatment). Data are mean ± SEM.

^a $P < 0.01$ vs. saline.

^b $P < 0.05$ vs. saline.

has been described in the pancreas, yet direct interaction with BIM-28163 via peripheral administration produced no significant effect on insulin secretion. Results from both *GHS-R* (16) and *ghrelin* null (14) mice also suggest that ghrelin exerts only a minimal role in regulating insulin or leptin levels, because these parameters remain largely unchanged in both animal models. Indeed, the relationship between ghrelin and insulin secretion is far from clear because, depending on the dose, model, and species, ghrelin has been reported to both stimulate and suppress insulin secretion (32). The present results may suggest a central mechanism for stimulation of

insulin secretion as well as provide evidence that this analog does not cross the blood-brain barrier; however, additional knowledge is clearly needed to fully interpret the present results on leptin and insulin secretion.

The fact that BIM-28163 treatment, either icv or sc, does not change feeding behavior is surprising because both GHS and exogenous ghrelin do stimulate food intake via GHS-R1a (16). Moreover, suppression of feeding has been reported in mice after icv injections, using two other antagonists: [D-Lys₃]-GHRP6, an analog of one of the synthetic GHSs or [D-Arg,D-Phe,D-Trp,Leu]-substance P, an analog of sub-

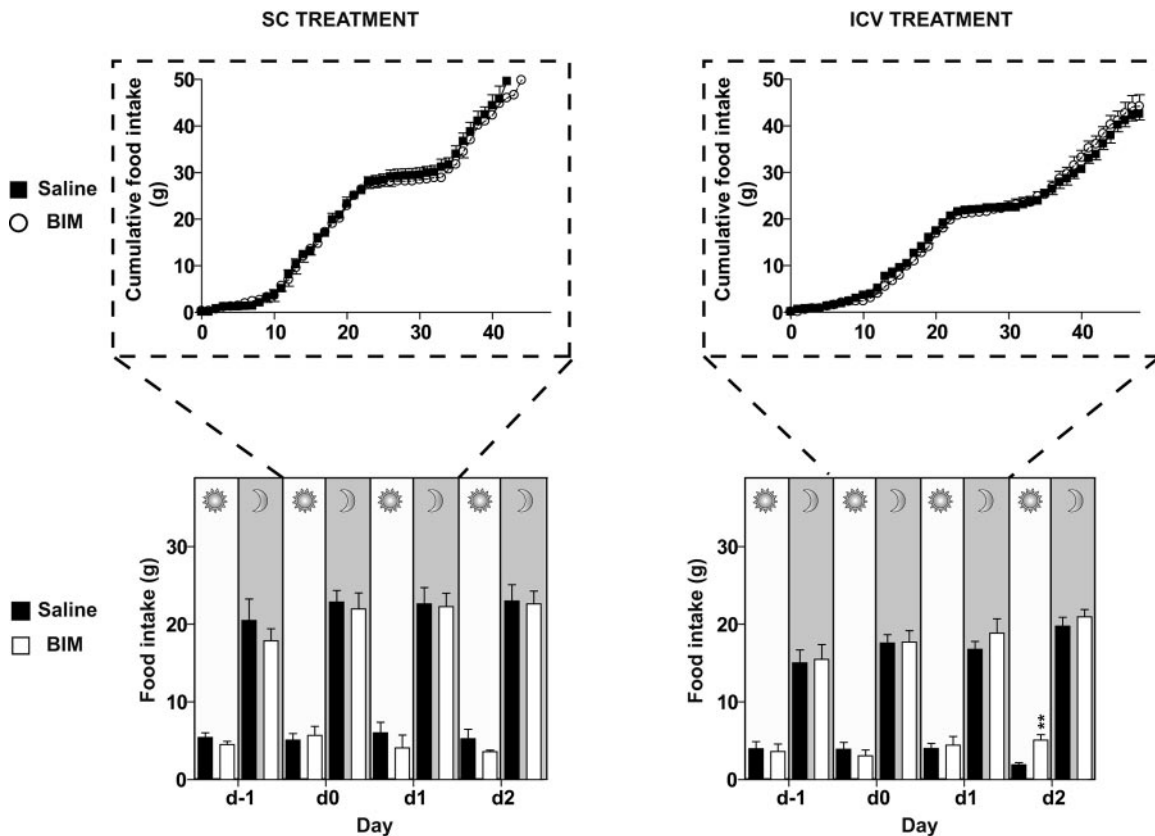


FIG. 4. Effect of subchronic sc (left) or icv (right) administration of BIM-28163 (open symbols) or saline (closed symbols) on food intake. Top, Cumulative food intake during the 48 h after infusion; bottom, food intake measured during both the diurnal (0700–1900 h) and nocturnal (1900–0700 h) period before, during, and after treatment.

stance P (26). Results with these compounds may be difficult to interpret because the first also binds to four of the melanocortin receptors (33) and the second antagonizes many peptide receptors (34, 35). A recent report indicated that the GHS-R1a displays a high constitutive activity and that [D-Arg,D-Phe,D-Trp,Leu]-substance P is a full inverse agonist, rather than a true antagonist (36). One might therefore hypothesize that the GHS-R1a involved in GH regulation and in food intake may have different levels of constitutive activity and, subsequently, different responses to inverse agonists and antagonists. Alternatively, it cannot be excluded that another, as yet unknown, ghrelin receptor may exist. Structural variants of GHS-R have been found in the human, swine, chicken, and fish genome (37–39). A truncated version of the GHS receptor, derived from alternative gene splicing, GHS-R1b, and not yet observed in the rat, cannot be the novel ghrelin receptor because it binds neither ghrelin nor any of the various GHS molecules. However, GHS-R1b, or another receptor, may interact with GHS-R1a, perhaps through receptor heterodimerization as shown in fish (39), thereby playing a counterregulatory role in controlling either GH secretion or food intake.

Another potential explanation of the discrepant results using GHS-R1a antagonists may rely on the central or peripheral location of the ghrelin systems involved. Central ghrelin probably stimulates food intake and GH secretion through neural mechanisms involving neuronal circuitry (40). An important site for GHS-R1a mediation of GH secretion is the hypothalamic arcuate nucleus (41), where GHS-R mRNA is expressed on both GHRH and neuropeptide Y-expressing neurons (21). However, peripheral ghrelin can also modulate food intake and GH secretion via vagal afferent fibers (42). Blockade of the vagal afferent, either through vagotomy or through perivagal capsaicin application, totally blocks peripheral ghrelin effects on feeding, whereas it only attenuates the stimulation of GH secretion.

In summary, this study shows that pharmacological dissociation of the effects of endogenous ghrelin on GH secretion and feeding is possible. It will remain to be determined whether other effects of this interesting peptide, such as those on adiposity or cardiac function, can also be separately affected. At any rate, the present data support the feasibility of creating ghrelin analogs with selective actions on either GH or feeding behavior.

Acknowledgments

Received February 18, 2005. Accepted May 20, 2005.

Address all correspondence and requests for reprints to: J. Epelbaum, Unité Mixte de Recherche 549, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-Paris 5, 2ter rue d'Alésia, 75014 Paris, France. E-mail: jacques.epelbaum@broca.inserm.fr.

References

- 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* 114:1537–1545
- 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 SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Van der Ploeg LH, et al. 1996 A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974–977
- 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
- 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
- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop 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
- Lu S, Guan JL, Wang QP, Uehara K, Yamada S, Goto N, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Shioda S 2002 Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 321:157–160
- Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, Rio MC, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT 2001 In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 73:54–61
- Seoane LM, Tovar S, Baldelli R, Arvat E, Ghigo E, Casanueva FF, Dieguez C 2000 Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats. *Eur J Endocrinol* 143:R7–R9
- Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR 2000 The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141:4325–4328
- Tschop M, Smiley DL, Heiman ML 2000 Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908–913
- Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT 2002 Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 143:1353–1361
- 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
- Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C 2001 Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24:RC19–R21
- Sun Y, Ahmed S, Smith RG 2003 Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol* 23:7973–7981
- 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
- Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG 2004 Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4679–4684
- Halem HA, Taylor JE, Dong JZ, Shen Y, Datta R, Abizaid A, Diano S, Horvath T, Zizzari P, Bluet-Pajot MT, Epelbaum J, Culler MD 2004 Novel analogs of ghrelin: physiological and clinical implications. *Eur J Endocrinol* 151(Suppl 2):S071–S205
- Bluet-Pajot MT, Durand D, Drouva SV, Mounier F, Pressac M, Kordon C 1986 Further evidence that thyrotropin-releasing hormone participate in the regulation of growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 44:70–75
- Ezan E, Laplante E, Bluet-Pajot MT, Mounier F, Mamas S, Grouselle D, Grognet JM, Kordon C 1997 An enzyme immunoassay for rat growth hormone: validation and application to the determination of plasma levels and in vitro release. *J Immunoassay* 18:335–356
- Veldhuis JD, Johnson ML 1986 Cluster analysis: a simple, versatile, and robust algorithm for endocrine pulse detection. *Am J Physiol* 250:E486–E493
- 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
- 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
- Chapman IM, Bach MA, Van Cauter E, Farmer M, Krupa D, Taylor AM, Schilling LM, Cole KY, Skiles EH, Pezzoli SS, Hartman ML, Veldhuis JD, Gormley GJ, Thorner MO 1996 Stimulation of the growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis by daily oral administration of a GH secretagogue (MK-677) in healthy elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4249–4257
- Okimura Y, Ukai K, Hosoda H, Murata M, Iguchi G, Iida K, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K 2003 The role of circulating ghrelin in growth hormone (GH) secretion in freely moving male rats. *Life Sci* 72:2517–2524

25. Cheng K, Chan WW, Barreto Jr A, Convey EM, Smith RG 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* 124:2791–2798
26. 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
27. Shuto Y, Shibasaki T, Otagiri A, Kuriyama H, Ohata H, Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I 2002 Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest* 109:1429–1436
28. Akamizu T, Takaya K, Irako T, Hosoda H, Teramukai S, Matsuyama A, Tada H, Miura K, Shimizu A, Fukushima M, Yokode M, Tanaka K, Kangawa K 2004 Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *Eur J Endocrinol* 150:447–455
29. Kim MS, Namkoong C, Kim HS, Jang PG, Kim Pak YM, Katakami H, Park JY, Lee KU 2004 Chronic central administration of ghrelin reverses the effects of leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:1264–1271
30. Humbel RE 1990 Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 190:445–462
31. Guler HP, Zapf J, Schmid C, Froesch ER 1989 Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121:753–758
32. Broglio F, Gottero C, Benso A, Prodam F, Volante M, Destefanis S, Gauna C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Ghigo E 2003 Ghrelin and the endocrine pancreas. *Endocrine* 22:19–24
33. Schiöth HB, Muceniec R, Wikberg JE 1997 Characterization of the binding of MSH-B, HB-228, GHRP-6 and 153N-6 to the human melanocortin receptor subtypes. *Neuropeptides* 31:565–571
34. Holst JJ, Knuhtsen S, Orskov C, Skak-Nielsen T, Poulsen SS, Nielsen OV 1987 GRP-producing nerves control antral somatostatin and gastrin secretion in pigs. *Am J Physiol* 253:G767–G774
35. Woll PJ, Rozengurt E 1988 [D-Arg1,D-Phe5,b-Trp7,9,Leu11]substance P, a potent bombesin antagonist in murine Swiss 3T3 cells, inhibits the growth of human small cell lung cancer cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1859–1863
36. 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
37. McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD 1997 Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol* 11:415–423
38. Geelissen SM, Beck IM, Darras VM, Kuhn ER, Van der Geyten S 2003 Distribution and regulation of chicken growth hormone secretagogue receptor isoforms. *Gen Comp Endocrinol* 134:167–174
39. Chan CB, Cheng CH 2004 Identification and functional characterization of two alternatively spliced growth hormone secretagogue receptor transcripts from the pituitary of black seabream *Acanthopagrus schlegelii*. *Mol Cell Endocrinol* 214:81–95
40. 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
41. Dickson SL, Luckman SM 1997 Induction of *c-fos* messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. *Endocrinology* 138:771–777
42. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M 2002 The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123:1120–1128

Erratum

After publication of the articles titled “Glucocorticoid Receptor Blockade Disinhibits Pituitary-Adrenal Activity during the Stress Hyporesponsive Period of the Mouse” (*Endocrinology* 146:1458–1464, 2005) by M. Schmidt, S. Levine, M. S. Oitzl, M. van der Mark, M. B. Müller, F. Holsboer, and E. R. de Kloet and “Differential Expression of *c-fos* and Tyrosine Hydroxylase mRNA in the Adrenal Gland of the Infant Rat: Evidence for an Adrenal Hyporesponsiveness Period” (*Endocrinology* 143:1717–1725, 2002) by Darren K. Okimoto, Alison Blaus, Mathias Schmidt, M. Kathleen Gordon, Gershman W. Dent, and Seymour Levine, one of the authors, Mathias Schmidt, added a second initial to his name; the complete name is now Mathias V. Schmidt (or M. V. Schmidt).

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

Lorsque nous avons commencé les travaux devant faire l'objet de cette thèse, nous venions de montrer que chez le rat vigile l'administration de ghreline induit, non seulement et comme attendu, une augmentation de la libération d'hormone de croissance (Tolle *et al.*, 2001) mais aussi une sensation de faim traduite chez l'animal par une prise de nourriture dans les 5 minutes suivant l'injection et ceci quel que soit le moment de la journée (article 1). Ces résultats ont été trouvés par de nombreux autres auteurs chez différentes espèces : chez l'homme (Arvat *et al.*, 2000; Nagaya *et al.*, 2001; Peino *et al.*, 2000; Takaya *et al.*, 2000) pour la GH ; (Wren *et al.*, 2001) pour la prise alimentaire, chez le mouton (Grouselle, article soumis), chez le chien (Yokoyama *et al.*, 2005), chez le rat et la souris (Date *et al.*, 2000; Seoane *et al.*, 2000; Wren *et al.*, 2000) pour la GH ; (Nakazato *et al.*, 2001; Shintani *et al.*, 2001; Wren *et al.*, 2000) pour la prise alimentaire), chez le poulet (Furuse *et al.*, 2001) pour la prise alimentaire, chez le poisson (Riley *et al.*, 2002) pour la GH).

Nous avons également contribué à montrer que la ghreline stimule la sécrétion de GH par une action à la fois directe au niveau hypophysaire (Kojima *et al.*, 1999; Tolle *et al.*, 2001) et indirecte au niveau hypothalamique, cette dernière conduisant à une augmentation de la libération de GHRH (Tannenbaum *et al.*, 2003) et à une inhibition de celle de somatostatine (Tolle *et al.*, 2001).

Parallèlement il avait été montré que l'augmentation de la prise alimentaire suite à l'injection de ghreline est majoritairement due à une activation des neurones hypothalamiques à neuropeptide Y/AgRP (Bewick *et al.*, 2005; Nakazato *et al.*, 2001).

Dès lors une nouvelle question se posait :

Quel rôle la ghreline endogène joue-t-elle

- **dans la régulation de la sécrétion d'hormone de croissance ?**
- **dans le contrôle de la prise alimentaire ?**

Pour tenter d'y répondre nous avons utilisé deux approches:

Nous avons :

I)

- A. caractérisé la sécrétion de ghreline en mesurant ses taux circulants
- B. recherché une éventuelle corrélation entre les variations de ces taux et soit les variations des concentrations plasmatiques de GH, soit les modifications du comportement alimentaire.

II) Nous avons bloqué l'effet de la ghreline endogène relayé par le récepteur GHS-R1A en traitant les animaux avec un antagoniste de ce récepteur

RESULTATS

I) Sécrétion de ghreline

➤ A1) Détermination des taux de ghreline plasmatique

La mesure des taux circulants de ghreline nécessite :

- un dosage spécifique, le plus sensible possible.

Dans la circulation sanguine la ghreline existe sous la forme octanoylée et la forme non octanoylée, cette dernière étant très majoritaire (près de 98% pour (Hosoda *et al.*, 2000), 80% pour (Akamizu *et al.*, 2005)).

Dans les premières expériences que nous avons réalisées (articles 1 et 3) nous n'avions à notre disposition qu'un kit de dosage radio-immunologique commercialisé par la société Phoenix. Les anticorps utilisés dans ce kit sont dirigés contre la partie C terminale du peptide et ne permettent pas de différencier la forme octanoylée de la non octanoylée. Les taux mesurés correspondent donc en principe à la somme des 2 formes (= ghreline totale). La limite de détection de ce dosage est de 50pg/ml.

Par la suite nous avons développé au laboratoire deux dosages immunoenzymatiques dont les caractéristiques sont présentées dans l'annexe « matériel et méthodes ». Le premier pour mesurer les concentrations en « ghreline totale » (Anticorps dirigé contre la partie C terminale fourni par Catherine Tomasetto) a une limite de détection 100pg/ml et le second pour mesurer les concentrations en ghreline octanoylée (Anticorps dirigé contre la partie N terminale fourni par H.Hosoda) a une limite de détection 20pg/ml.

En ce qui concerne la ghreline totale les valeurs que nous avons obtenues par EIA sont 3 à 4 fois plus élevées que celles que nous avons par RIA. L'absence de standard international rend difficile la comparaison des résultats obtenus à partir de dosages différents. Une étude publiée récemment dans *Clinical Chemistry* et évaluant les taux de ghreline humaine chez 151 patients à l'aide de kits provenant des Sociétés Linco et Phoenix montre qu'il existe un facteur 10 entre les valeurs obtenues avec les 2 kits, cette différence disparaissant si un même standard est utilisé (Groschl *et al.*, 2004).

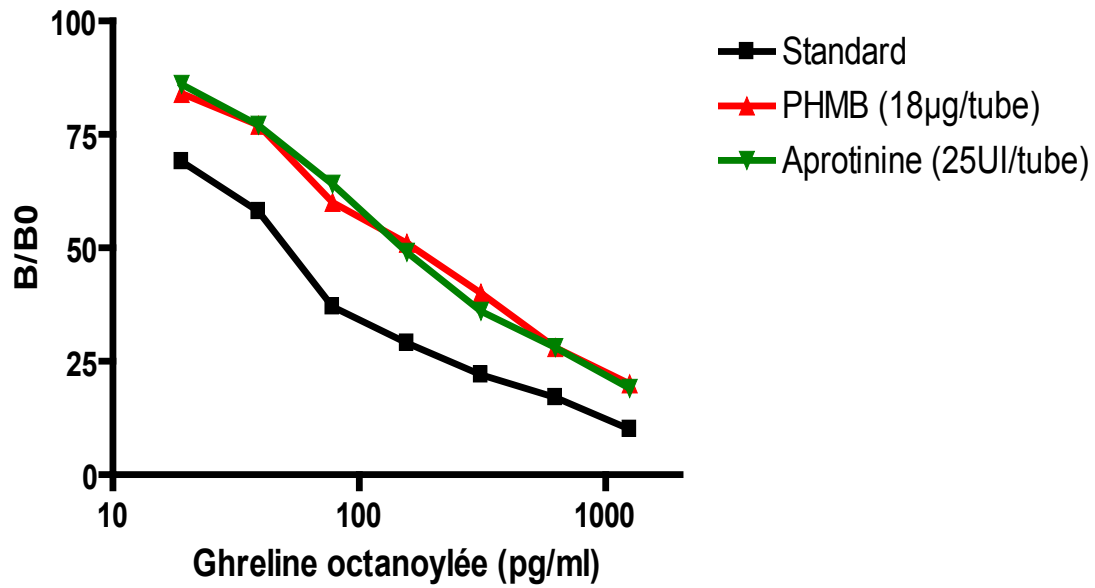


Figure 1R : Absence d'interférence des inhibiteurs de protéases dans le dosage EIA de la ghreline octanoylée.

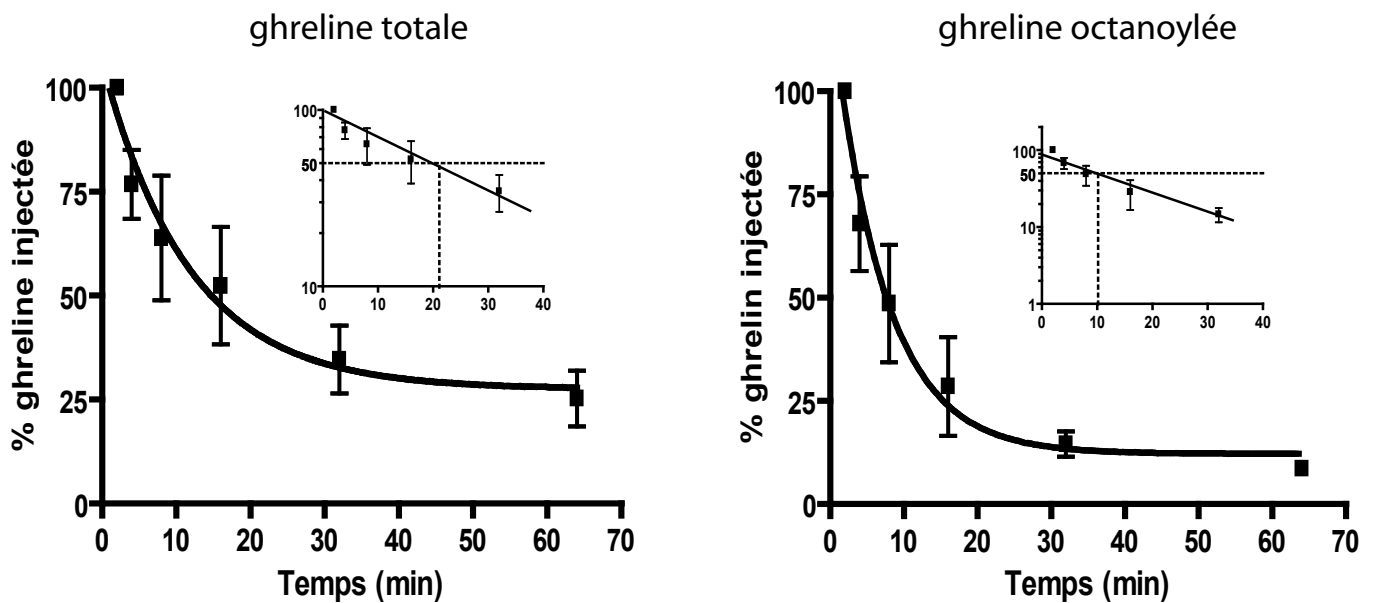


Figure 2R : Détermination de la 1/2 vie de la ghreline exogène dans le plasma de rat. Les concentrations de ghreline "totale" et octanoylée sont mesurées par EIA dans le plasma après injection IV de 10 µg de peptide synthétique.

En ce qui concerne la ghreline octanoylée nous avons également observé un facteur 2 entre les valeurs évaluées à l'aide d'un standard fourni par Phoenix (utilisé lors des premiers dosages) et celles évaluées à l'aide d'un standard fourni par NeoMPS (utilisé actuellement). Ce problème rend difficile la comparaison des valeurs absolues de ghreline d'une part au cours du temps dans un même laboratoire et d'autre part d'un laboratoire à l'autre.

- des conditions de prélèvement et de conservation des échantillons sanguins permettant d'éviter toute dégradation.

Dans les premières études (articles 1 et 3) où seule la ghreline totale était mesurée, les échantillons sanguins ont été recueillis dans des tubes contenant de l'EDTA (1mg/ml de sang), centrifugés immédiatement à 4°C et le plasma a été congelé à -20°C. Nous avons au préalable vérifié que dans ces conditions les concentrations de ghreline mesurées dans le plasma de 3 rats ne variaient pas si le plasma était conservé 0, 30, ou 60 minutes à 4°C et s'il n'était pas décongelé-recongelé plus de 3 fois.

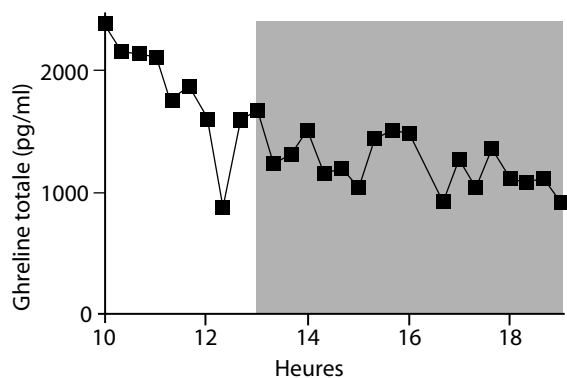
Par la suite pour doser la ghreline octanoylée, ce qui impliquait de limiter sa dégradation, un inhibiteur de protéases (PHMB 0,36mg/ml sang ou aprotinine 500U/ml sang) a été ajouté à l'EDTA. En effet il a été montré que la ghreline serait désoctanoylée par différentes estérases dont une carboxylestérase dans le plasma de rat et une butyrylcholinestérase dans le plasma humain (De Vriese *et al.*, 2004). Ni le PHMB, ni l'aprotinine n'interfèrent dans le dosage (figure 1R). Dans ces conditions de recueil les taux de ghreline restent stables après 2 décongelations puis diminuent progressivement (de l'ordre de 15% après 4 décongelations).

- un intervalle de temps entre 2 prélèvements tenant compte de la $\frac{1}{2}$ vie de l'hormone. Une estimation de cette $\frac{1}{2}$ vie a été obtenue en injectant une quantité connue de ghreline octanoylée et en mesurant sa concentration dans le sang à différents temps post injection (2, 4, 8, 16, 32, 64 min). La figure 2R montre les résultats obtenus : 24.5 \pm 3.2 min (n=8) pour la ghreline totale (dans ces conditions sont mesurées la ghreline octanoylée plus celle qui a été désoctanoylée) et 10.8 \pm 1.1 min (n=11) pour la ghreline octanoylée.

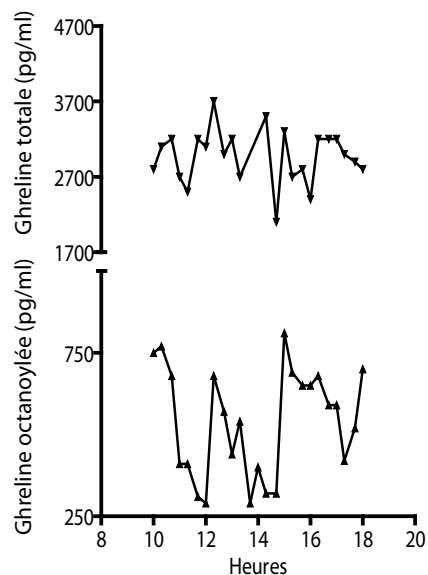
➤ **A2) Profil de sécrétion plasmatique de ghreline**

Ⓐ

Expérience 1



Expérience 2



Ⓑ

	Ghreline totale (n=8)	Ghreline totale (n=8)	Ghreline octanoylée (n=8)
Taux moyens (pg/ml)	1170 ±270	4620 ±820	887 ±105
Nadir (pg/ml)	1090 ±400	3067 ±320	637 ±98
Amplitude des pics (pg/ml)	1690 ±480	5375 ±603	1352 ±173
Nombre de pics	2,7 ±0,4/9h	2,5 ±0,3/8h	2,7 ±0,4/8h
Intervalle entre 2 pics (min)	128 ±18	137 ±15	117 ±10
ApEn	0,958 ±0,058	0,8987 ±0,0416	0,8898 ±0,0358

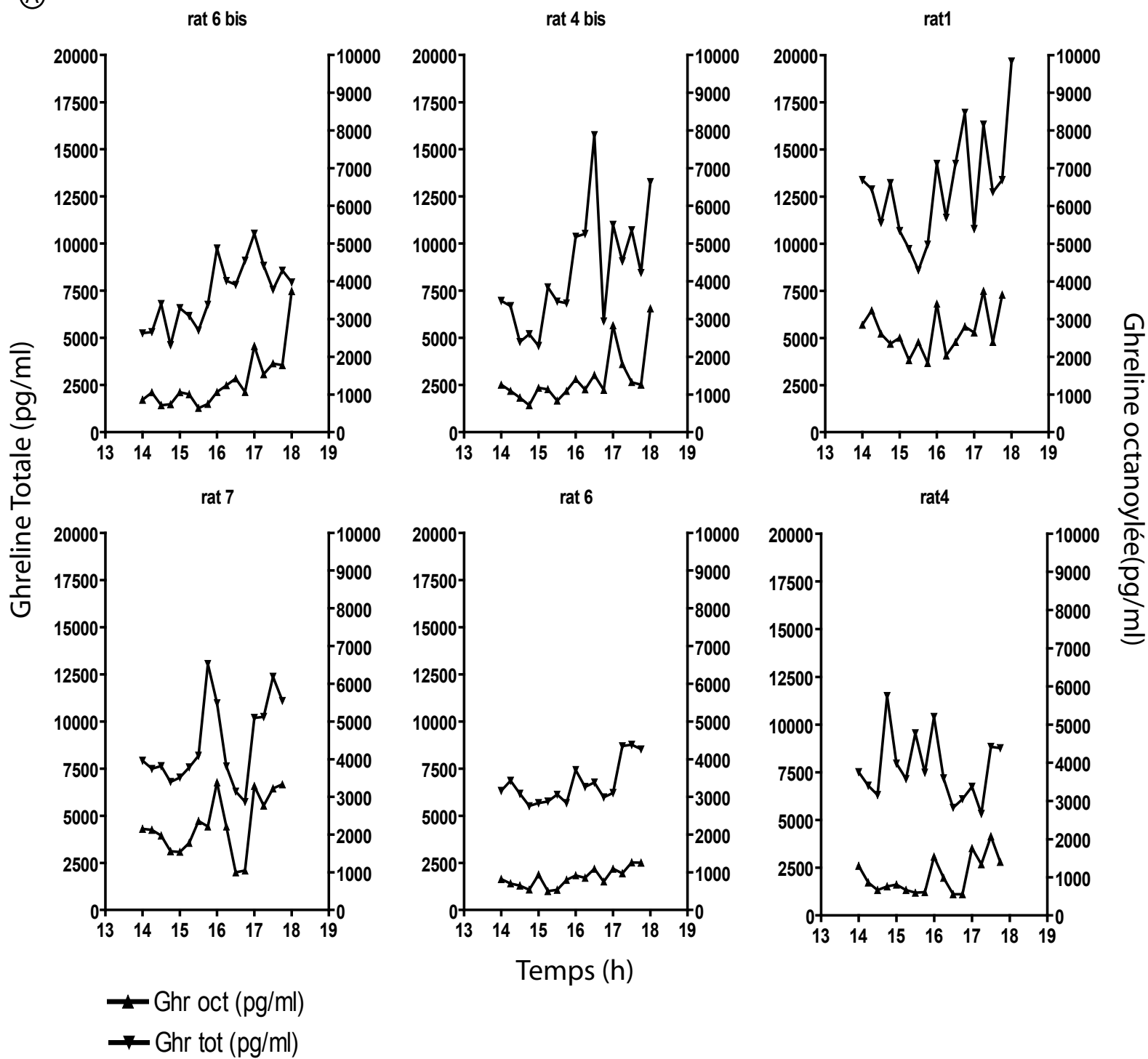
Figure 3R : Sécrétion spontanée de ghreline

A- Profils individuels représentatifs de la sécrétion de ghreline totale exp1 (à gauche), de ghreline totale et octanoylée exp 2 (à droite).

B- Analyse cluster et ApEn de la pulsativité de ghreline.

Cluster n=2, p=1, t=2, MD et CV 20 et 7% pour la ghreline octanoylée, 100 et 4% pour la ghreline totale.

Ⓐ



Ⓑ Corrélation ghreline Totale/ghreline octanoylée

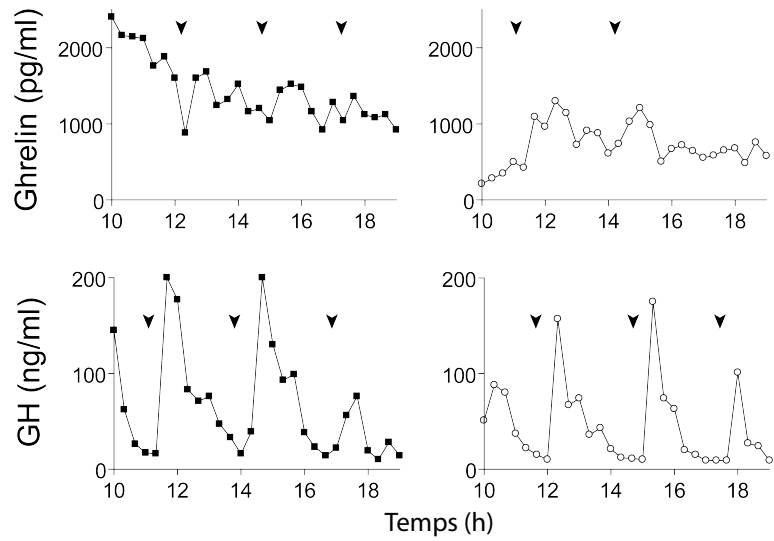
# du rat	Rat 1	Rat 4	Rat 4b	Rat 6	Rat6b	Rat 7	Total
r	0,63	0,63	0,19	0,70	0,48	0,81	0,73
P	0,0084	0,0070	0,4854	0,0025	0,0491	0,0001	<0,0001

Ⓒ Rapport ghreline octanoylée/ghreline Totale

# du rat	Rat 1	Rat 4	Rat 4b	Rat 6	Rat6b	Rat 7	Total
Rapport oct/Totale (%)	21,6±1,0	16,7±1,3	13,7±1,6	12,7±0,7	18,0±2,2	25,3±1,2	18,0±0,7

Figure 4R : Sécrétion spontanée de ghreline totale et de ghreline octanoylée
 A- Profils individuels obtenus chez 6 rats prélevés toutes les 15 minutes pendant 4h
 B- Corrélation entre les taux de ghreline totale et de ghreline octanoylée pour chaque rat. Cette corrélation est significative pour 5 d'entre eux.
 C- Pourcentage de ghreline octanoylée par rapport au taux de ghreline totale calculé point par point pour chaque animal

Expérience 1



Expérience 2

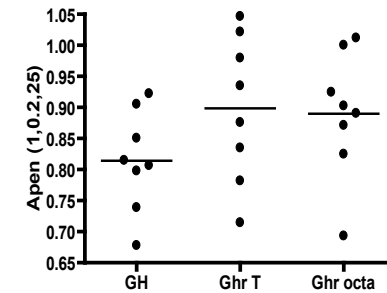
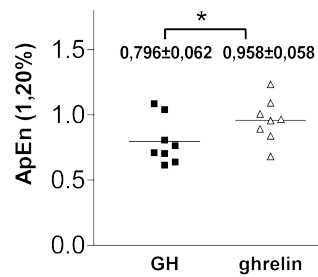
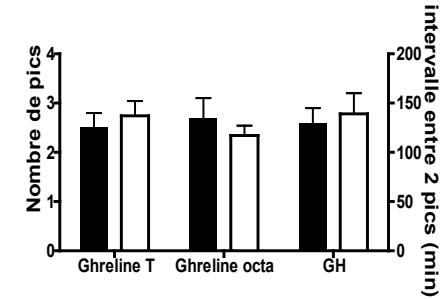
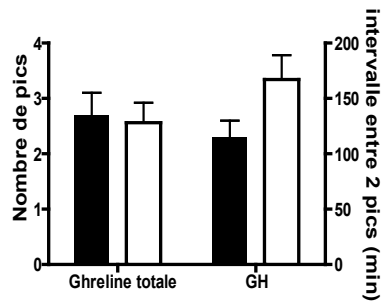
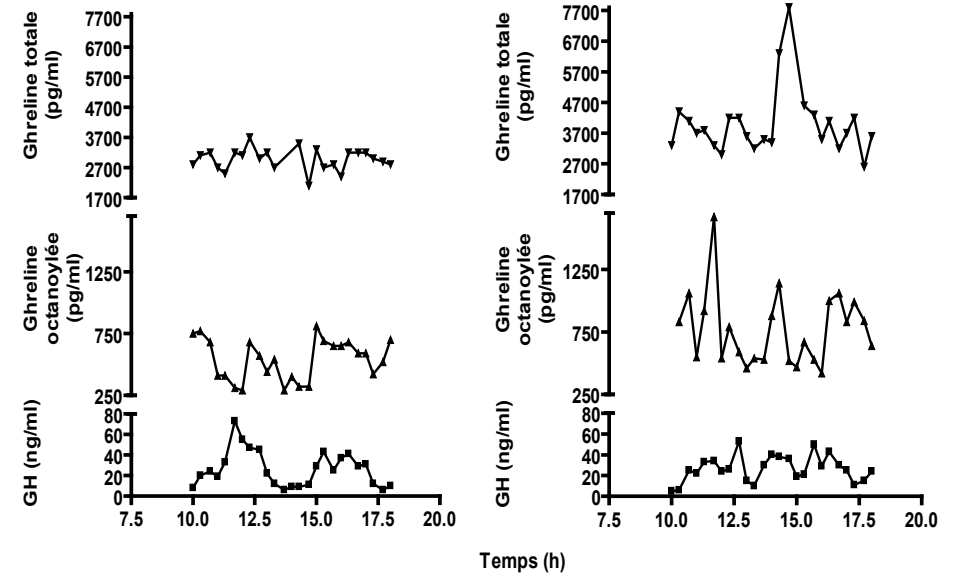


Figure 5R : Sécration spontanée de GH, ghreline totale et de ghreline octanoylée
 Résultats obtenus lors de la 1ère expérience (panneau de gauche), et de la deuxième expérience (panneau de droite)
 A- Profils individuels de sécrétion de GH, ghreline totale et de ghreline octanoylée, représentatifs des expériences 1 et 2
 B- Nombre de pics et intervalle entre deux pics obtenus par analyse cluster
 C- Les valeurs d'ApEn indiquent que les pics de GH sont légèrement plus réguliers que ceux de ghreline totale ou octanoylée.

Toutes nos expériences *in vivo* ayant pour but de caractériser le mode de sécrétion d'hormones sont effectuées chez des rats vigiles et libres de leurs mouvements, porteurs d'une canule intracardiaque à demeure qui permet de faire des prélèvements et/ou des injections intraveineuses sans manipuler l'animal.

Trois expériences successives ont été réalisées pour caractériser la sécrétion de ghreline

Dans la première expérience, des prélèvements sanguins ont été effectués toutes les 20 minutes pendant 9 heures et les concentrations plasmatiques en ghreline totale ont été mesurées par dosage RIA Phoenix (article 1). Dans ces conditions nous avons pu montrer pour la première fois que, chez le rat, la sécrétion de ghreline est rythmique avec des pics d'amplitude moyenne de l'ordre de 160% de la valeur basale toutes les 2h environ (figure 3R).

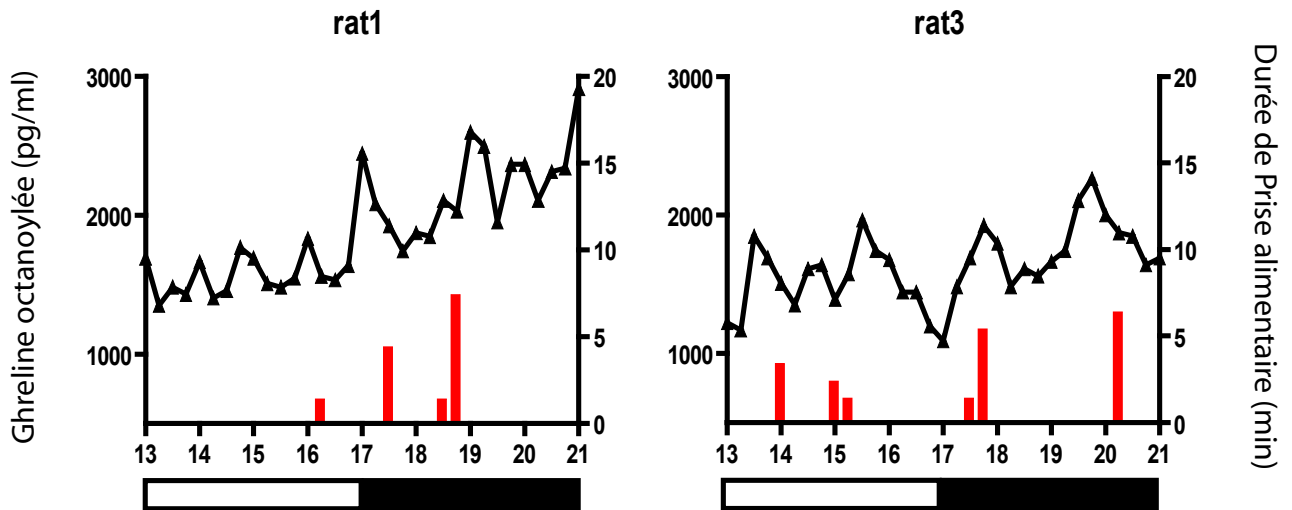
Ces résultats néanmoins ne reflétaient pas forcément les variations plasmatiques de la forme octanoylée, la seule capable d'activer le récepteur GHS-R1a (Hosoda *et al.*, 2000; Kojima *et al.*, 1999). Pour cette raison un dosage EIA spécifique de cette forme ainsi qu'un dosage EIA de la ghreline totale ont été mis au point et une expérience préliminaire effectuée sur 6 rats prélevés toutes les 15 minutes pendant 4 heures a mis en évidence, chez 5 d'entre eux, une corrélation significative entre taux de ghreline totale et taux de ghreline octanoylée, cette dernière représentant $18,0 \pm 0,7\%$ du taux de ghreline totale (figure 4R).

La deuxième expérience, dans les mêmes conditions que la première, montre, de plus, que les paramètres de pulsativité analysés par Cluster sont identiques pour ghreline totale et ghreline octanoylée (figure 3R). La régularité d'apparition des pics est comparable pour les 2 formes comme le montrent les valeurs d'ApEn. Toutefois ces pics ne semblent pas strictement synchronisés (Cross ApEn = $1,152 \pm 0,039$)

➤ **B) Relation entre taux plasmatiques de ghreline et taux plasmatiques de GH d'une part et comportement alimentaire d'autre part**

La mesure des concentrations plasmatiques de GH dans les 2 expériences précédentes montrent que GH, ghreline totale (article 1 et fig 5R) et ghreline octanoylée (figure 5R) sont libérées de façon rythmique avec un nombre de pics et un intervalle moyen entre les pics similaires pour les trois. Néanmoins la sécrétion de ghreline (totale ou octanoylée) est plus irrégulière que celle de GH comme le montrent les valeurs d'ApEn (article 1, figure 5R).

Ⓐ



Ⓑ

Rats n°	1	2	3	4	5	6	7	Globalement
Nombre d'épisodes de PA	3	3	4	2	0	4	2	2,6±0,5
Nombre de pics de ghreline	4	3	3	4	6	5	4	4,1±0,4
Episodes PA précédés d'une augmentation de ghreline	3	3	3	1	0	3	1	14/18
Episodes PA suivis d'une diminution de ghreline	2	3	2	1	0	3	0	11/14

Figure 6R : Sécrétion spontanée de ghreline et prise alimentaire chez des animaux soumis à l'éclairage de 5h à 17h, prélevés de 13h à 21h toutes les 15 minutes

A- Profils individuels caractéristiques de sécrétion de ghreline octanoylée et de prise nourritrice (évaluée en temps passé à manger par période de 10 minutes).

B- Analyse individuelle des pics de ghreline octanoylée et des épisodes de prise alimentaire.

Par contre les variations des taux de ghreline plasmatique semblent mieux corrélés avec le comportement alimentaire. Dans la première série d'expérience ces taux diminuent de 26% dans les 20 minutes qui suivent l'arrêt des épisodes de prise de nourriture (991 ± 170 vs. 1338 ± 222 pg/ml, $P = 0.0032$ test t apparié). Il existe une meilleure synchronisation des rythmes GH/prise alimentaire et ghreline/prise alimentaire que des rythmes de sécrétion GH/ghreline comme le montre une analyse Cross-ApEn (article 1).

Dans une troisième expérience 7 animaux ont été prélevés toutes les 15 min (au lieu de 20 min) dans les 4 h qui précèdent et les 4 h qui suivent l'extinction des lumières afin de mieux définir les relations entre variations de ghreline octanoylée et prise alimentaire dans les périodes diurnes et nocturnes. 18 épisodes de prise alimentaire ont été observés. Dans 77% des cas les taux de ghreline octanoylée ont augmentés de $20 \pm 4\%$ dans la demie heure qui précédait la prise alimentaire et chez 79% de ces animaux la ghreline diminue de $15 \pm 2\%$ dans la demie heure qui suit (Figure 6R)

II) Effet d'un antagoniste du récepteur GHS-R1a.

La plupart des effets de la ghreline sont, au moins en partie, dûs à une activation du récepteur GHS-R1a. Pour tenter de définir le rôle de la ghreline endogène dans le contrôle de la sécrétion d'hormone de croissance et/ou dans celui du contrôle de la prise alimentaire nous avons donc traité des animaux avec un antagoniste fonctionnel de ce récepteur (article 2)

Le BIM-28163 (obtenu dans le cadre d'un contrat avec la société Biomeasure)

- in vitro déplace la ghreline humaine liée sur le GHS-R1a et diminue la mobilisation de calcium induite par la ghreline dans des cellules CHO-K1 qui expriment le GHS-R1a.
- in vivo abolit la réponse GH à la ghreline

L'administration continue SC ($300 \mu\text{g}/\text{rat}$ en IP à l'initiation puis $6 \mu\text{g}/\text{h}$ pendant 10h) ou ICV ($5 \mu\text{g}/\text{h}$ pendant 48h) de BIM-28163, entraîne pendant la durée du traitement une

diminution de l'amplitude des pics de sécrétion spontanée de GH (SC : 37 ± 6 vs 69 ± 11 ng/ml ; $P<0,05$; ICV : 70 ± 10 vs 38 ± 5 ; $P<0,05$), les autres paramètres caractéristiques de la pulsativité (nombre de pics, intervalle, nadir) ainsi que les taux d' IGF-1 restant inchangés. Cet effet est réversible : lorsque nous avons testé les animaux 15h après l'interruption du traitement l'amplitude des pics de sécrétion de GH avaient des valeurs comparables à celles des témoins (SC : 101 ± 13 vs 81 ± 13 ; ns). Dans les mêmes conditions de traitement seule une très légère augmentation de la prise alimentaire a été observée dans la phase diurne après 36h de traitement ICV.

DISCUSSION

Sécrétion de ghrelina

Ces résultats montraient pour la première fois que, chez le rat, la sécrétion de ghrelina se fait selon un rythme ultradien. Dans nos conditions expérimentales (prélèvement toutes les 20 min pendant 9h chez des rats SD mâles) nous avons observé des pics d'amplitude modérée (de l'ordre de 180% du nadir) toutes les 2h-2h30. Par la suite une rythmicité soit ultradienne soit circadienne a été décrite par d'autres auteurs dans différentes espèces. Chez le rat, Bagnasco et al (Bagnasco *et al.*, 2002) utilisant un protocole différent (prélèvement toutes les 5 min pendant 190 min chez des femelles SD) observent des pics plus fréquents (toutes les 30 min) néanmoins leur méthode d'analyse prend en compte des pics de très faible amplitude (120% du nadir) et un dimorphisme sexuel ne peut être exclu. Chez le mouton seul un rythme circadien a été décrit (Sugino *et al.*, 2002). Chez l'homme la plupart des études montrent un rythme à la fois ultradien et circadien (Cummings *et al.*, 2001; Shiiya *et al.*, 2002; Yildiz *et al.*, 2004) avec des taux de ghrelina qui augmentent en période pré-prandiale et diminuent en période post-prandiale et un pic nocturne chez des sujets conditionnés au préalable (notamment prise des repas à heure fixe et rythme jour nuit fixe). Par contre le pic nocturne n'est pas observé par Avram et al (Avram *et al.*, 2005) et aucune rythmicité n'est décrite par Barkan et al. (Barkan *et al.*, 2003) bien que les profils moyens représentés dans son article semblent en contradiction avec son affirmation.

Toutes ces études évaluent la sécrétion de ghrelina totale (forme octanoylée + forme non octanoylée), or seule la forme octanoylée est capable d'activer le récepteur GHSR 1a qui,

en l'état actuel de nos connaissances, relaie, au moins en partie, l'effet de la ghreline sur la sécrétion de GH et la prise alimentaire. Il était donc important de caractériser la sécrétion de ghreline octanoylée afin de mieux déterminer son rôle physiologique. Pour ce faire nous avons mis au point d'une part, un dosage EIA spécifique de cette forme et d'autre part des conditions de prélèvement et de conservation permettant de limiter au maximum la désoctanoylation. Cette dernière étant due à différentes estérases dont une carboxylestérase dans le plasma de rat et une butyrylcholinestérase dans le plasma humain (De Vriese *et al.*, 2004) les échantillons sanguins ont été recueilli dans des tubes à 4°C contenant un inhibiteur de protéases. Dans ces conditions nous avons observé une rythmicité assez proche de celle obtenue pour la ghreline totale ; toutefois si les pics apparaissent avec une fréquence équivalente ils ne semblent pas totalement synchrones.

La ghreline circulante proviendrait principalement de l'estomac mais aucune donnée à l'heure actuelle ne permet de dire si les formes octanoylée et non octanoylée sont co-régulées et co-sécrétées. Les seules données disponibles concernent le rapport entre les concentrations des 2 formes dans l'estomac. Le rapport octa/non octa varie selon les études : environ 2,3 (Hu *et al.*, 2005) et 1,8 (Nishi *et al.*, 2005) chez la souris ; 1,3 (Toshinai *et al.*, 2001) et 1 (Beck *et al.*, 2003) chez le rat. Ce rapport dépend de différents facteurs notamment de l'état nutritionnel (Toshinai *et al.*, 2001) et de la concentration en acides gras libres dont il a été montré qu'ils sont directement utilisés pour l'octanoylation ; en effet l'ingestion de ces acides gras entraîne une augmentation de la concentration en ghreline octanoylée sans modification ni de la quantité de messenger ni de la concentration en ghreline totale (Nishi *et al.*, 2005). Par ailleurs l'identification d'une enzyme de désoctanoylation (Lysophospholipase I) dans l'estomac suggère que la forme octanoylée peut être désoctanoylée localement (Shanado *et al.*, 2004).

La genèse de la rythmicité de la sécrétion de ghreline reste à déterminer : est elle intrinsèque aux cellules de l'estomac produisant la ghreline ou est elle due à un contrôle par des signaux afférents sur ces cellules ?

Récemment il a été montré que la majorité de la ghreline octanoylée circulerait liée à une ou des protéines de haut poids moléculaire (Patterson *et al.*, 2005). D'après les résultats rapportés par ces auteurs un anticorps dirigé contre la partie N terminal de la ghreline, comme celui que nous utilisons, reconnaît à la fois la forme libre et la forme liée. Dans ces conditions les taux de ghreline octanoylée que nous avons mesurés ne correspondent pas à la forme libre probablement la seule directement disponible. D'une part il serait intéressant de doser cette forme libre, la seule solution pour l'instant étant de la séparer de la forme liée par

chromatographie, l'utilisation de détergent comme le triton s'étant avéré inefficace. D'autre part il faudrait identifier et déterminer le rôle de ces protéines : jouent elles le rôle classique de protéines de liaison en protégeant la ghreline de la dégradation tout en régulant la quantité de peptide disponible ?

Ghreline et hormone de croissance

Nous avons montré

- d'une part que la ghreline est sécrétée selon un rythme ultradien proche de celui de la GH. Néanmoins, si l'intervalle moyen entre 2 pics est comparable pour les 2 hormones, la régularité d'apparition de ces pics semble meilleure pour la GH
- d'autre part que le blocage du récepteur GHSR1a par un antagoniste entraîne une diminution de l'amplitude des pics de GH sans modifier le rythme de sécrétion de l'hormone.

Ces résultats suggèrent que la ghreline endogène n'interviendrait pas dans la genèse de la pulsativité de GH (pas de corrélation stricte sécrétion de ghreline/sécrétion de GH et pas de modification du rythme lors du traitement par l'antagoniste du GHSR1a) mais amplifierait, via une activation du GHSR1a, le patron de sécrétion du à l'interaction GHRH-SRIH hypothalamique. La non implication dans la genèse de la pulsativité est surprenante. En effet il a été préalablement établi que, *in vitro*, la ghreline est capable d'augmenter la libération de GHRH (Tannenbaum *et al.*, 2003) et d'inhiber celle de SRIH (Tolle *et al.*, 2001), 2 conditions qui sont nécessaires pour obtenir une augmentation de la libération de GH (la GHRH ne pouvant stimuler la GH qu'en présence d'un tonus somatostatinergique bas (Tannenbaum et Ling, 1984). Nous nous attendions à ce qu'une augmentation de ghreline circulante soit suivie d'une augmentation de GH, néanmoins il est possible que l'inhibition de la libération de SRIH par la ghreline ne soit pas suffisante pour permettre à la GHRH de stimuler la GH et dans ce cas la ghreline augmenterait seulement l'amplitude des pics de GH qui apparaîtraient en même temps qu'un pic de ghreline. Il serait donc intéressant maintenant de déterminer les profils de ghreline octanoylée libre et de rechercher s'ils sont en relation stricte avec ceux de GH ou sinon, si les pics de GH qui suivent un pic de ghreline ont une amplitude plus importante. Chez l'homme des profils de sécrétion de ghreline et de GH ont été évalués sur 24h (Avram *et al.*, 2005; Barkan *et al.*, 2003), aucune relation entre les 2 hormones n'est mise en évidence (analyse de cross corrélation), néanmoins dans ces études la ghreline octanoylée libre n'a pas été mesurée non plus.

Chez des rats exprimant un antisens du RNA messager du GHSR sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase (TH) et donc ayant une diminution sélective des récepteurs GHSR dans le noyau arqué et notamment de ceux localisés sur les neurones à GHRH (qui expriment la TH), la sécrétion de GH est diminuée seulement chez la femelle (Shuto *et al.*, 2002). Chez cette dernière la rythmicité de GH est irrégulière et les taux de base sont plus élevés que chez le mâle ce qui a conduit Robinson *et al.* à proposer que les taux de somatostatine seraient plus bas et plus continus chez la femelle que chez le mâle (Robinson, 1991). Ainsi chez la femelle la ghreline n'aurait pas à contrecarrer des doses importantes de SRIF et pourrait jouer un rôle plus important dans la régulation de la sécrétion de GH en stimulant la libération de GHRH. Ceci pourrait aussi expliquer la plus grande amplitude de la réponse GH suite à l'injection d'un GH sécrétagogue ou de ghreline chez la femelle (Sartor *et al.*, 1985; Schmid *et al.*, 2005). Néanmoins cette différence liée au sexe n'est pas observée par tous les auteurs (Broglia *et al.*, 2003; Jacks *et al.*, 1994) et pourrait dépendre d'autres facteurs. Il serait donc intéressant de réaliser l'expérience proposée ci-dessus (mesure de GH et ghreline octanoylée libre) chez des rats, ce qui permettrait également de répondre à d'autres questions : est-ce que les taux de ghreline octanoylée libre comme ceux de ghreline totale (Barkan *et al.*, 2003) sont plus élevés chez les femelles? est-ce que l'expression du GHSR par les neurones à GHRH de l'ARC est différente selon le sexe?

Ghreline et comportement alimentaire

Une relation plus étroite existe entre variations des taux de ghreline et épisode de prise alimentaire. Dans de nombreux cas (plus de 75%) un épisode de prise alimentaire est précédé par une augmentation des taux de ghreline et suivi par une diminution de ces taux. Ceci a été également décrit chez l'homme par certains auteurs (Cummings *et al.*, 2001; Tschöp *et al.*, 2001) mais ne permet pas de dire si une augmentation de ghreline endogène induit le comportement alimentaire ou si au contraire une modification de ce comportement entraîne une modification des taux de ghreline. La ghreline endogène participe à la régulation du comportement alimentaire comme le montre la diminution de prise alimentaire après utilisation d'un antagoniste des récepteurs GHS-R1a ou immunisation passive de la ghreline endogène (Asakawa *et al.*, 2003; Nakazato *et al.*, 2001). Il est possible qu'une augmentation des taux circulants de ghreline contribue à l'initiation d'un repas puisqu'il a été bien montré qu'une injection de ghreline entraîne une prise alimentaire quasi immédiate chez le rat et chez

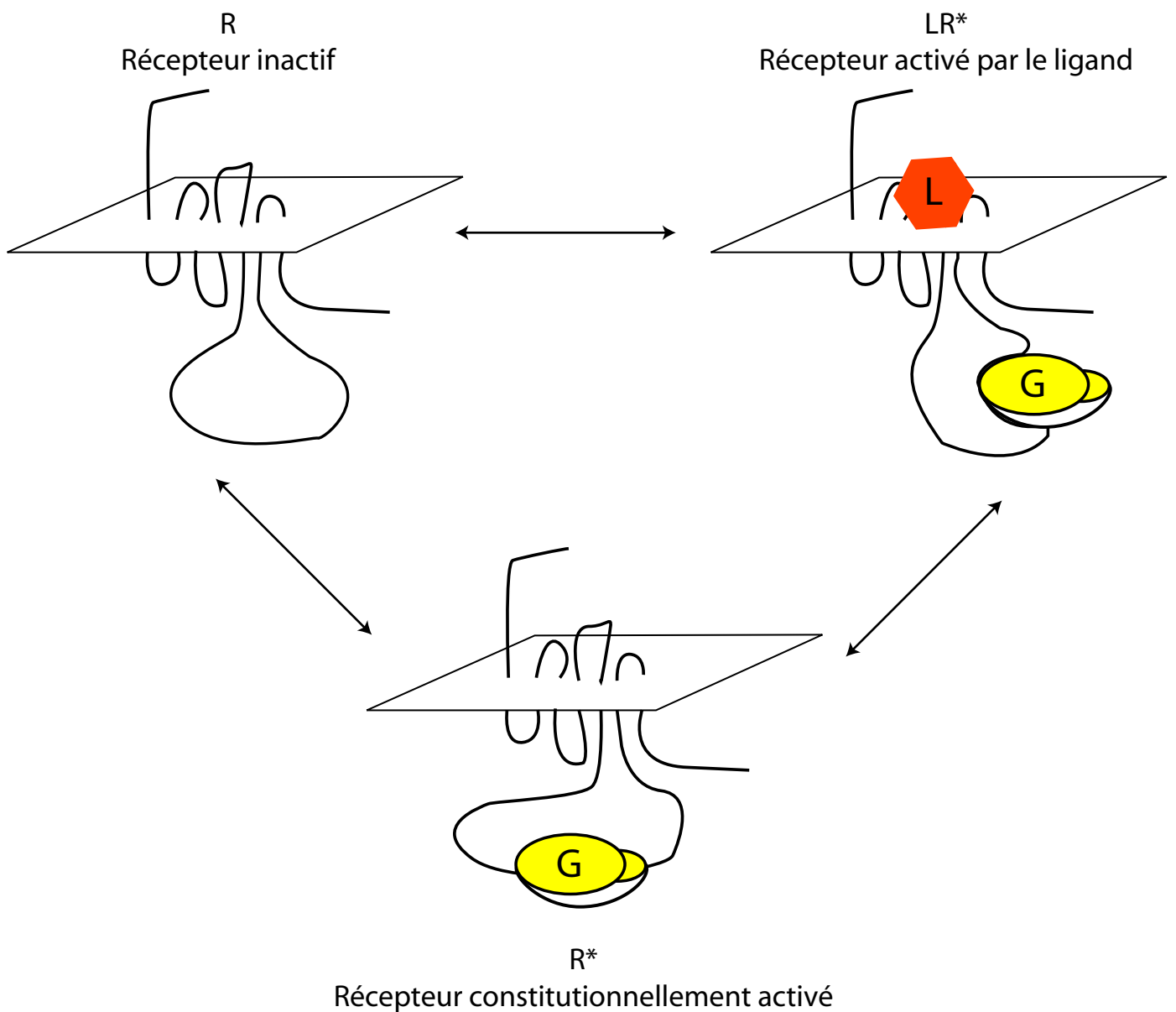


Figure 18 : D'après Gbahou et al (2003). Les récepteurs couplés aux protéines G sont des protéines allostériques qui peuvent présenter des conformations différentes. Les protéines G vont interagir avec le récepteur lorsque ce dernier est activé soit spontanément (R*) soit par le ligand (LR*). La compétition entre LR* et R* pour les protéines G peut faire qu'un même ligand présente des propriétés agoniste (En l'absence de R* ou Efficacité $LR^* > R^*$), antagoniste neutre (Efficacité $LR^* = R^*$) ou agoniste inverse (Efficacité $LR^* < R^*$).

l'homme (Schmid *et al.*, 2005; Tolle *et al.*, 2002; Tschop *et al.*, 2000; Wren *et al.*, 2001; Wren *et al.*, 2000). La diminution des taux de ghreline par contre serait due, au moins en partie, à l'action au niveau de l'estomac des nutriments ingérés notamment au glucose (Ariyasu *et al.*, 2001; Nakagawa *et al.*, 2002; Shiiya *et al.*, 2002), cette diminution étant proportionnelle à la quantité de calories consommée (Callahan *et al.*, 2004).

Enfin tous les pics de ghreline ne correspondent pas à des épisodes de prise alimentaire ce qui laisse supposer que, comme pour son action sur la GH, la ghreline endogène ne peut être efficace sur le comportement alimentaire que dans certaines conditions. L'effet orexigène de la ghreline est relayé, en partie, par les neurones à NPY/AgRP du noyau arqué hypothalamique. En effet un prétraitement soit par un anticorps anti NPY ou anti AgRP soit par des antagonistes du NPY ou de l'AgRP inhibe la prise alimentaire induite par la ghreline (Kamegai 2000, Asakawa 2001, (Nakazato *et al.*, 2001; Shintani *et al.*, 2001) (Lawrence *et al.*, 2002) et par ailleurs l'administration de ghreline entraîne une augmentation des ARNm du NPY (Shintani *et al.*, 2001) et de l'AgRP (Kamegai *et al.*, 2001). A ce niveau la ghreline est en compétition avec la leptine et l'insuline qui exercent une action inhibitrice sur ces neurones. Il est donc envisageable que la ghreline ne soit capable d'activer ces neurones que lorsque le tonus inhibiteur est inférieur à un certain seuil.

Les résultats obtenus lors de la neutralisation du GHSR1a par différentes approches : traitement par un antagoniste (Asakawa *et al.*, 2003), rats transgéniques exprimant un antisens du RNAm du GHSR sous contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase et donc ayant une diminution de l'expression du récepteur au niveau de l'arqué (Shuto *et al.*, 2002), souris invalidées pour le gène du GHSR (Sun *et al.*, 2004) suggèrent que l'effet de la ghreline sur la prise alimentaire est relayé au moins en partie par ce récepteur puisque dans tous ces modèles il est très significativement diminué. Il est surprenant que lors du traitement par le BIM 28163 nous n'ayons pas observé de modification du comportement alimentaire. Néanmoins les récepteurs couplés aux protéines G sont des protéines allostériques qui peuvent exister sous différentes conformations en équilibre. Selon la conformation le récepteur peut être dans un état inactif ou actif et seul l'état actif permet l'interaction avec les protéines G pour initialiser la réponse. Ces conformations actives sont soit spontanées ce qui conduit à une activité constitutive du récepteur, soit induites par la liaison du ligand. Selon le rapport entre ces différentes conformations une même molécule ligand peut agir comme un agoniste, un agoniste inverse ou un antagoniste (Kenakin, 2001) (Figure 18). Il a été montré que le

GHSR1a pouvait exister sous une forme constitutivement active (Holst *et al.*, 2003). Il est possible que le rapport entre les différentes conformations diffère pour les récepteurs impliqués dans la régulation de GH d'une part et pour ceux impliqués dans la prise alimentaire d'autre part.

2^{ème} Partie

Sécrétion de ghreline dans des situations physiologiques ou pathologiques où sécrétion de GH et/ou comportement alimentaire sont modifiés

Article 3 : Tolle V, Kadem M, Bluet-Pajot MT, Frere D, Foulon C, Bossu C, Dardennes R, Mounier C, Zizzari P, Lang F, Epelbaum J, Estour B. Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jan;88(1):109-16

Article 4 : Rubino F, Zizzari P, Tomasetto C, Bluet-Pajot MT, Forgione A, Vix M, Grouselle D, Marescaux J. The role of the small bowel in the regulation of circulating ghrelin levels and food intake in the obese Zucker rat. *Endocrinology.* 2005 Apr;146(4):1745-51

Article 3 : Tolle V, Kadem M, Bluet-Pajot MT, Frere D, Foulon C, Bossu C, Dardennes R, Mounier C, Zizzari P, Lang F, Epelbaum J, Estour B. Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jan;88(1):109-16

Balance in Ghrelin and Leptin Plasma Levels in Anorexia Nervosa Patients and Constitutionally Thin Women

VIRGINIE TOLLE, MYRIAM KADEM, MARIE-THERESE BLUET-PAJOT, DELPHINE FRERE, CHRISTINE FOULON, CECILE BOSSU, ROLAND DARDENNES, CHANTAL MOUNIER, PHILIPPE ZIZZARI, FRANÇOIS LANG, JACQUES EPELBAUM, AND BRUNO ESTOUR

INSERM, U-549 (V.T., M.T.B.P., C.F., R.D., P.Z., J.E.), and Clinique des Maladies Mentales et de l'Encéphale (C.F., R.D.), 75014 Paris, France; and Services d'Endocrinologie et de Psychiatrie (M.K., D.F., C.B., C.M., F.L., B.E.), Hôpital de Bellevue, 42100 Saint Etienne, France

Ghrelin, a 28-amino acid octanoylated peptide, has recently been identified in rat stomach as an endogenous ligand for the GH secretagogue receptor. In addition to GH-releasing properties, exogenous ghrelin injections exert orexigenic effects in both rodents and humans. As the endogenous peptide appears directly related to feeding behavior, we assessed its plasma levels in anorexia nervosa (AN) patients before and after renutrition and in constitutionally thin subjects with body mass indexes (BMIs) equivalent to those of AN women but with no abnormal feeding behavior. The relationships between plasma ghrelin levels and other neuroendocrine and nutritional parameters, such as GH, leptin, T_3 , and cortisol, were also investigated. In AN patients, morning fasting plasma ghrelin levels were doubled compared with levels in controls, constitutionally thin subjects, and AN patients after renutrition. Twenty-four-hour plasma ghrelin, GH, and cortisol levels determined every 4 h were significantly increased, whereas 24-h plasma leptin levels were decreased in AN patients compared with controls and constitutionally thin subjects. Both plasma ghrelin and leptin levels

returned to control values in AN patients after renutrition. Constitutionally thin subjects displayed intermediate 24-h plasma ghrelin and leptin levels, significantly different from controls and AN patients, whereas GH and cortisol were not modified. Ghrelin was negatively correlated with BMI, leptin, and T_3 in controls, constitutionally thin subjects, and AN patients, whereas no correlation was found between GH and ghrelin or between cortisol and ghrelin. Ghrelin and BMI or T_3 were still correlated after renutrition, suggesting that ghrelin is also a good nutritional indicator. Basal and GHRH-stimulated GH release were significantly increased in AN patients only. In conclusion, ghrelin is increased in AN and constitutionally thin subjects who display very low BMI but different eating behaviors, suggesting that not only is ghrelin dependent on body fat mass, but it is also influenced by nutritional status. Even though endogenous ghrelin is not strictly correlated with basal GH secretion, it may be involved in the magnitude of GHRH-induced GH release in AN patients. (*J Clin Endocrinol Metab* 88: 109–116, 2003)

ANOREXIA NERVOSA (AN) is a syndrome generally seen in young women under 25 yr that combines weight loss, amenorrhea, and behavioral changes. Some of these changes appear to be reversible with weight gain (1–5). It is generally supposed that neuroendocrine abnormalities, probably of hypothalamic origin, are involved in this adaptation to the starvation state. In the same age range as anorexia nervosa, a non-pathologic state exists that has been termed constitutional thinness (6–8). These young women present with very low body mass indexes (BMIs; <17.5), but have normal menstruation and no changes in feeding behavior.

The neuroendocrine mechanisms regulating GH secretion are strongly dependent on nutritional state. In humans, fasting stimulates GH release, and AN patients show elevated basal GH in presence of low IGF-I levels (9). However, the mechanisms subserving these changes remain unclear. No data concerning the somatotrophic axis in constitutional thinness have been reported.

Ghrelin, an endogenous ligand for the GH secretagogue receptor (GHS-R) (10), has recently been identified in rat stomach

as a 27- or 28-amino acid peptide in which the serine 3 residue is *N*-octanoylated (11, 12). In addition to its GH-releasing properties, exogenous ghrelin injections exert potent orexigenic effects in rodents (13–16) and humans (17, 18). Both GH-releasing and orexigenic effects are likely to be mediated through intrahypothalamic GHS-R (19). In humans (20) and rats (21), endogenous plasma ghrelin levels are directly related to food intake episodes, and the stomach is the major source of circulating ghrelin (12). Moreover, preliminary data in a single sampling experiment suggested that plasma ghrelin levels are markedly elevated in AN patients and are negatively correlated with BMIs (22).

In the present work we assessed plasma ghrelin levels in AN patients before and after renutrition and in constitutionally thin subjects without feeding behavior disturbance and compared them with levels in control subjects. The relationships between plasma ghrelin levels and other neuroendocrine and nutritional status parameters such as GH, leptin, T_3 , and cortisol were also investigated.

Subjects and Methods

This study conforms with the policy of the ethical committee on human research of St. Etienne, France, and all subjects gave their written informed consent (including parental consent for minors).

Abbreviations: AN, Anorexia nervosa; AUC, area under the curve; BMI, body mass index; GHS, GH secretagogue; GHS-R, GH secretagogue receptor.

Subjects

Four groups of women (15–36 yr old) participated in the study. Nine women were diagnosed with AN. All patients met the criteria of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (22a). They took no medication or estroprogestative treatment and did not present bingeing or vomiting behavior. Secondary amenorrhea was a constant feature for at least 6 months. The same patients were followed during free refeeding. Blood sampling was performed at the initiation of this study and after a minimum weight gain of 10% according to initial weight, without preestablished delay (time range of the refeeding period, 2–15 months). Seven constitutionally thin subjects presented with BMI similar to the AN group before renutrition. Due to the rarity of these subjects, blood sampling was performed at different times in the menstrual cycle (2 in the early phase, 1 during the ovulatory peak, and 4 in the late phase of the cycle). These subjects had no body image disturbance or psychological disorders and were not amenorrheic. The control subjects were 10 age-matched cycling healthy women of normal weight without estroprogestative treatment. Blood sampling in these subjects was performed in the early phase of the cycle. None of the women included in the study was taking any medication.

Experimental protocols

Body composition was evaluated by electrical impedance biometry with an ANALICOR 2 (Eugedia, Chambly, France). The patients rested in the supine position for at least 15 min. Two electrode needles were placed on clean and degreased skin at the limb ends. Two frequencies (50 and 100 kHz) were used at a current of 400 μ A. Fat mass was recorded as a percentage of body weight as a relative value. For statistical analysis, relative values were computed using normal theoretical parameters.

Peripheral hormones (free T_3 , IGF-I, and 17β -estradiol) were measured at 0800 h after an overnight fast. Hormone measurements were performed in controls in the early phase of the menstrual cycle and in constitutionally thin subjects in a later phase.

For evaluation of circadian variations in ghrelin, leptin, cortisol, and GH, blood samples were collected on EDTA at 0800, 1200, 1600, 2000, 2400, and 0400 h. Meals were taken immediately after the 0800 and 1200 h samplings and at 1900 h, before the 2000 h sampling.

For the dynamics of GHRH-induced GH release, an indwelling catheter was placed in an antecubital vein of the forearm, and blood samples were collected 20 and 0 min before and 15, 30, 60, 90, and 120 min after GHRH (Ferring Pharmaceuticals Ltd., Gentilly, France; 100 μ g, iv) injection. Blood samples were immediately centrifuged after collection, and plasma was stored at -80 C before assays.

Assay methods

Plasma GH levels were measured by immunoradiometric assay (Immunotech, Beckman Coulter, Inc., Marseilles France; intra- and interassay coefficients of variations, 2% and 14%, respectively; detection limit, 0.1 mU/liter; manufacturer's reference level, <5 mU/liter). Plasma IGF-I levels were measured by immunoradiometric assay (Immunotech; intra- and interassay coefficients of variations, 9% and 16%, respectively; detection limit, 12 μ g/liter; manufacturer's

reference range, 107–310 μ g/liter). Plasma ghrelin levels were determined by RIA (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA; intra- and interassay coefficients of variations, <10%; detection limit, 53 ng/liter). Plasma leptin levels were measured by RIA [Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA; intra- and interassay coefficients of variations, <5%; detection limit, 0.5 μ g/liter; manufacturer's reference range for normal BMI (18–25), 3.7–11.1 μ g/liter]. Plasma cortisol levels were measured by RIA (Immunotech; intra- and interassay coefficients of variations, 6% and 8%, respectively; detection limit, 13 nmol/liter; normal range at 0800 h, 263–724 nmol/liter). Free T_3 was measured by RIA (Beckman; intra- and interassay coefficients of variations, 6% and 5%, respectively; detection limit, 0.5 pmol/liter; manufacturer's reference range, 2.5–5.8 pmol/liter). 17β -Estradiol levels were determined by RIA (DiaSorin, Inc., Antony, France; intra- and interassay coefficients of variations, 6% and 7%, respectively; detection limit, 5 ng/liter).

Statistical analysis

Data are the mean \pm SEM, and statistical analyses were performed by ANOVA and paired *t* test using StatView 4.5 software (Abacus Concepts, Inc., Palo Alto, CA).

Results

Clinical and endocrine parameters

Clinical and hormonal parameters are summarized in Table 1. In patients with AN, body weight and BMI were strongly reduced compared with healthy controls in the same age range. This denutrition concerned mainly body fat mass, which represented only 10.7% of the total body mass. Morning fasting IGF-I, 17β -estradiol, and free T_3 levels were decreased. After renutrition, body weight, BMI, and percentage of fat mass only partially recovered, whereas peripheral hormone levels returned to control values.

In constitutionally thin women, mean BMI was not different from that in AN patients, although body composition was very different; the percentage of fat mass was equivalent to controls (23.2% fat mass in controls vs. 19.6% in constitutionally thin subjects). IGF-I and free T_3 plasma levels were similar to control values and significantly different from levels in AN women. 17β -Estradiol levels were significantly higher than levels in controls and AN women before and after renutrition, confirming the presence of menstrual cyclicity in these subjects.

TABLE 1. Clinical and endocrine parameters of control subjects, patients with AN before and after renutrition, and constitutionally thin subjects after an overnight fast

	Control subjects	AN patients	AN patients after renutrition	Constitutionally thin subjects
Age (yr)	23.2 \pm 1.1 (10)	17.2 \pm 0.9 ^{a,d} (9)	N/A	23.3 \pm 3.1 (8)
Body weight (kg)	57.5 \pm 3.2 (10)	39.2 \pm 1.3 ^{c,k} (9)	49.0 \pm 2.5 ^{a,h,d} (9)	41.4 \pm 1.1 ^{c,j} (8)
BMI (kg/m ²)	21.5 \pm 0.7 (10)	14.6 \pm 0.4 ^{c,l} (9)	17.9 \pm 0.7 ^{c,d,i} (9)	15.7 \pm 0.4 ^{c,j} (8)
Fat mass (%)	23.2 \pm 1.1 (6)	10.7 \pm 1.1 ^{c,f,j} (7)	16.3 \pm 2.1 ^b (5)	19.6 \pm 1.6 ⁱ (8)
IGF-I (μ g/liter)	270 \pm 28 (8)	137 \pm 23 ^{a,e,l} (9)	365 \pm 41 ⁱ (9)	301 \pm 52 ^h (8)
17β -Estradiol (ng/liter)	41.0 \pm 7.8 (9)	12.3 \pm 2.6 ^{b,f} (9)	18.9 \pm 3.2 ^{a,f} (9)	68.4 \pm 11.6 ^{b,i,l} (7)
Free T_3 (pM/liter)	4.0 \pm 0.3 (9)	2.6 \pm 0.2 ^{b,f,k} (9)	3.7 \pm 0.2 ^h (9)	4.1 \pm 0.3 ⁱ (8)

Data represent mean \pm SD (no. of subjects). N/A, Not applicable.

^a *P* < 0.05, ^b *P* < 0.01, ^c *P* < 0.001 vs. control subjects.

^d *P* < 0.05, ^e *P* < 0.01, ^f *P* < 0.001 vs. constitutionally thin subjects.

^g *P* < 0.05, ^h *P* < 0.01, ⁱ *P* < 0.001 vs. AN patients.

^j *P* < 0.05, ^k *P* < 0.01, ^l *P* < 0.001 vs. AN patients after renutrition.

Plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in controls, AN patients, AN patients after renutrition, and constitutionally thin subjects

The mean morning fasting plasma ghrelin level was 208 ± 21 ng/liter in young control women ($n = 9$) and 270 ± 45 ng/liter in constitutionally thin subjects ($n = 5$). It reached 491 ± 68 ng/liter ($n = 8$) in AN patients and returned to 269 ± 24 ng/liter ($n = 8$) in AN patients after renutrition. Individual values are illustrated in Fig. 1. The mean decrease in ghrelin levels in AN patients after renutrition reached $39 \pm 8\%$.

Circadian hormonal variations

In control subjects plasma ghrelin levels, sampled every 4 h, displayed only small variations across the nycthemere (Fig. 2). In contrast, a marked circadian variation in ghrelin was observed in AN patients, with higher plasma levels at night (by paired *t* test: $P < 0.05$, 2000 vs. 0400 h). These patients exhibited increased plasma ghrelin levels compared with controls ($P < 0.001$), and levels returned to control values after renutrition and partial weight recovery. Constitutionally thin subjects displayed less regular and intermediate ghrelin levels, significantly different from levels in controls ($P < 0.001$), AN patients ($P < 0.001$), and AN patients after renutrition ($P < 0.05$).

In control subjects and AN patients after renutrition, plasma leptin levels displayed circadian variations with an important rise during the night (by paired *t* test: $P < 0.05$, 2000 vs. 0400 h). Such variations were absent in AN patients who presented with constantly undetectable (<2 $\mu\text{g/liter}$) plasma leptin levels, significantly different from those in the control population ($P < 0.001$). In constitutionally thin women whose BMI was equivalent to that in AN women, leptin was significantly higher than in AN patients ($P < 0.001$), but leptin circadian variations were blunted compared with those in controls ($P < 0.001$) and AN patients after renutrition ($P < 0.001$).

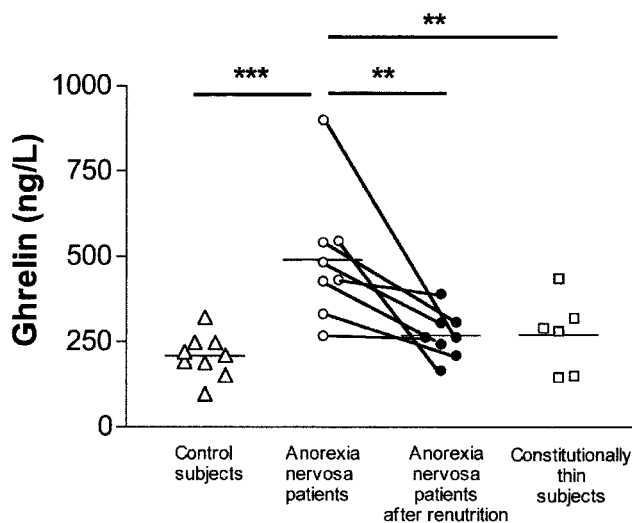


FIG. 1. Individual plasma ghrelin levels in control subjects (Δ ; $n = 9$), AN patients before (\circ) and after (\bullet) renutrition ($n = 8$), and constitutionally thin subjects (\square ; $n = 6$) after an overnight fast. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Plasma GH levels were markedly elevated in AN patients compared with controls (mean 24-h concentrations, 23.5 ± 14.1 vs. 4.7 ± 1.3 $\mu\text{g/liter}$; $P < 0.001$). GH levels were not significantly different from controls in constitutionally thin subjects (7.6 ± 1.7 $\mu\text{g/liter}$) or AN patients after renutrition (5.8 ± 1.2 $\mu\text{g/liter}$).

Plasma cortisol levels were significantly increased in AN patients compared with controls, AN patients after renutrition, and constitutionally thin subjects ($P < 0.001$). However, the circadian rhythmicity of plasma cortisol was maintained in AN patients, with higher levels at 0800 h and a decline until 2400 h (by paired *t* test: $P < 0.0001$).

Correlations between circulating ghrelin and BMI, GH, leptin, cortisol, and T_3

These correlations are illustrated in Fig. 3. Controls, constitutionally thin subjects, and AN patients before renutrition (group A) were compared with controls, constitutionally thin subjects, and AN patients after renutrition (group B). In group A the mean plasma ghrelin levels were negatively correlated with BMI ($r = -0.596$; $P < 0.001$), leptin ($r = -0.410$; $P < 0.05$), and free T_3 ($r = -0.610$; $P < 0.001$). After partial weight recovery (group B), the negative correlation between ghrelin and leptin was no longer significant, whereas ghrelin and BMI ($r = -0.395$; $P < 0.05$) and ghrelin and free T_3 ($r = -0.482$; $P < 0.05$) were still correlated. Correlations were not significant between ghrelin and cortisol or between ghrelin and GH in both groups.

Dynamics of GHRH-induced GH response in controls, AN patients before and after renutrition, and constitutionally thin subjects in relation to plasma ghrelin levels

The amplitude of GHRH-induced GH release was 4-fold higher in AN patients than in controls ($P < 0.01$; Fig. 4). In all groups, GHRH-induced GH release reached a maximum 30–60 min after the injection and returned to basal values after 120 min, except for the AN group (Fig. 4A, left panel).

After renutrition, the GH response to GHRH was significantly decreased compared with that in AN patients ($P < 0.05$) and was similar to that observed in constitutionally thin subjects (Fig. 4A, right panel).

Mean ghrelin plasma levels were positively correlated to the GH area under the curve (AUC) after GHRH stimulation for controls, constitutionally thin subjects, and AN patients ($r = 0.602$; $P < 0.01$; Fig. 4B, left panel), but not for AN patients after partial weight recovery ($r = 0.277$; $P = \text{NS}$; Fig. 4B, right panel). Correlations were not significant between GH and IGF-I AUCs in both groups.

Discussion

The aim of this study was to evaluate the modifications in ghrelin and leptin plasma levels, two peripheral hormones implicated in the regulation of food intake through their respective hypothalamic receptors, in relation to other hormonal parameters in two groups of women presenting with abnormally low BMI: AN patients and constitutionally thin women.

AN is a severe eating disorder characterized by decreased

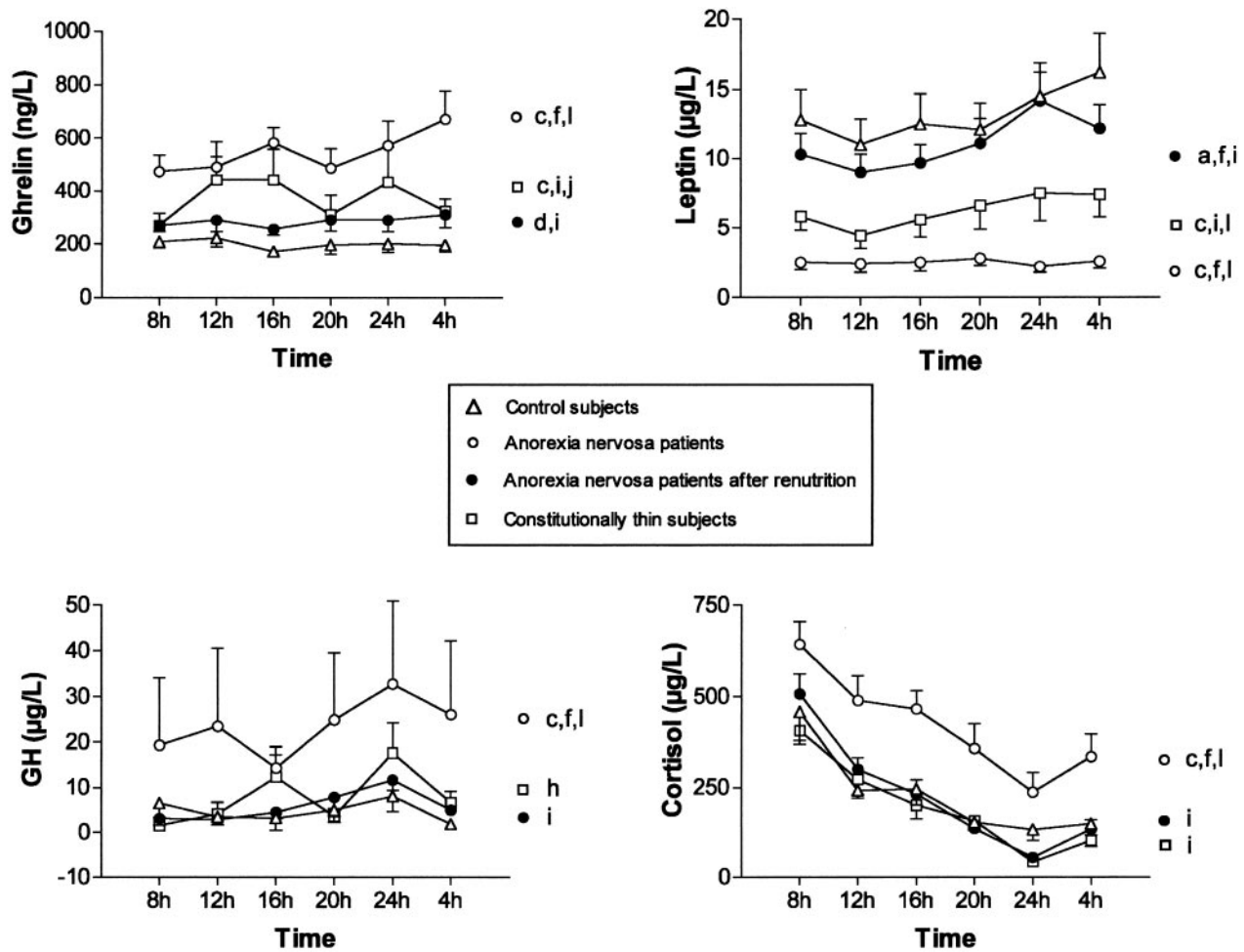


FIG. 2. Twenty-four-hour plasma ghrelin, leptin, GH, and cortisol levels in control subjects, AN patients before and after renutrition, and constitutionally thin subjects (symbols explained in Fig. 1). a, $P < 0.05$; c, $P < 0.001$ [vs. control subjects, by two-way ANOVA (time and group)]. d, $P < 0.05$; f, $P < 0.001$ (vs. constitutionally thin subjects). h, $P < 0.01$; i, $P < 0.001$ (vs. AN patients). j, $P < 0.05$; l, $P < 0.001$ (vs. AN patients after renutrition).

food intake, important weight loss (BMI, <17.5), and reduced body fat. It is associated with multiple endocrine changes that have been well described: hypercortisolism (23, 24), hypothyroidism (25), alteration of the GH-IGF-I axis with GH hypersecretion coupled with low IGF-I (2, 9), hypoleptinemia (26, 27), and amenorrhea (28). In contrast, constitutionally thin women, whose BMI is equivalent to AN patients, do not exhibit abnormal feeding behavior and caloric deficit, as indicated by the normal level of T_3 , a well established nutritional factor influenced by caloric restriction (29, 30) or overnutrition (31). Moreover, most endocrine parameters (17β -estradiol, cortisol, GH, and IGF-I) are not different from controls, which make them distinct from AN patients.

In both conditions of psychogen and hereditary thinness, morning fasting ghrelin concentrations increased compared with those in healthy age-matched women and remained higher across the nyctemere. The 2-fold increase observed in patients with AN and the return to control values after renutrition were consistent with the findings of previous studies (22, 32). The circadian rhythmicity of plasma ghrelin levels previously observed in normal subjects (20) was observed in constitutionally thin women and seemed to be

maintained in AN patients, who exhibited maximal ghrelin levels at night.

In AN, leptin levels are considerably decreased along the 24-h sampling period and return to control values after renutrition, as previously shown (26, 27, 33–35). This hormone is also decreased in constitutionally thin subjects who displayed intermediate values between AN patients and control subjects. Leptin concentrations are directly related to body fat mass (36, 37). Despite an equivalent BMI between AN patients and constitutionally thin subjects, body composition in this later group is equivalent to control subjects. In contrast, in AN patients, fat mass is strongly diminished. The net body mass in constitutionally thin subjects is consequently higher than that in AN women, in keeping with their intermediate plasma leptin concentrations.

Intermediate ghrelin levels in constitutional thinness indicate that circulating ghrelin is also dependent on the fat content, as suggested by the negative correlation between ghrelin and BMI found herein and previously (22, 32). However, despite the close correlation between BMI and circulating leptin or ghrelin, body adiposity is not the only determinant of leptin and ghrelin levels. In a recent study of

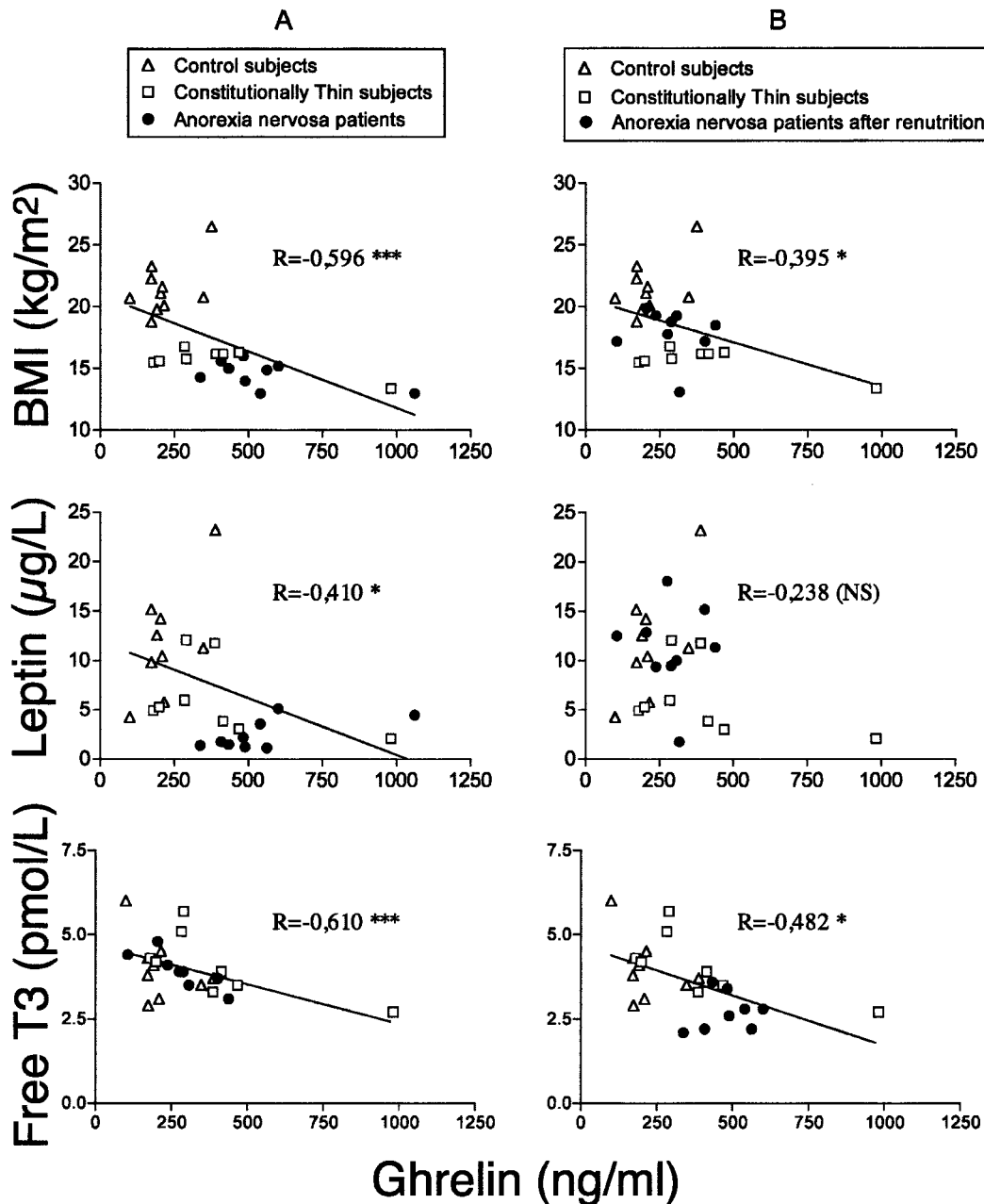


FIG. 3. Linear relationships between ghrelin and BMI, between ghrelin and leptin, and between ghrelin and free T₃. *Left panel*, Control subjects (△), constitutionally thin subjects (□) and AN patients (●). *Right panel*, Control subjects (△), constitutionally thin subjects (□), and AN patients after renutrition (●). *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

AN, bulimia nervosa, and binge-eating disorders, Monteleone *et al.* (38) proposed that factors other than body weight may also play a role in the determination of leptin levels (38). Leptin levels have been significantly correlated with eating behavior scores in patients with distinct BMI and feeding behaviors such as AN and bulimia nervosa (39).

Circulating ghrelin levels are also influenced by changes in energy intake. During short-term fasting, an increase in circulating ghrelin is observed independently of changes in body fat content (15). Furthermore, in the present study ghrelin levels returned to control values in AN subjects after renutrition despite an only partial body weight recovery.

These data together with the negative correlation between ghrelin and T₃ in individuals exhibiting different nutritional status (*i.e.* control, AN, and constitutional thinness) as well as in populations with identical nutrition (*i.e.* control, AN after renutrition, and constitutional thinness) suggest that ghrelin is a good nutritional indicator.

A considerable amount of evidence indicates that ghrelin and leptin exert opposite metabolic actions. Ghrelin elicits orexigenic and adipogenic effects in both rats (13–15, 40) and humans (17, 41), whereas leptin is anorexigenic and promotes adipolysis (42, 43). These antagonistic effects are likely to be relayed via modulation of neuropeptide Y/agouti-

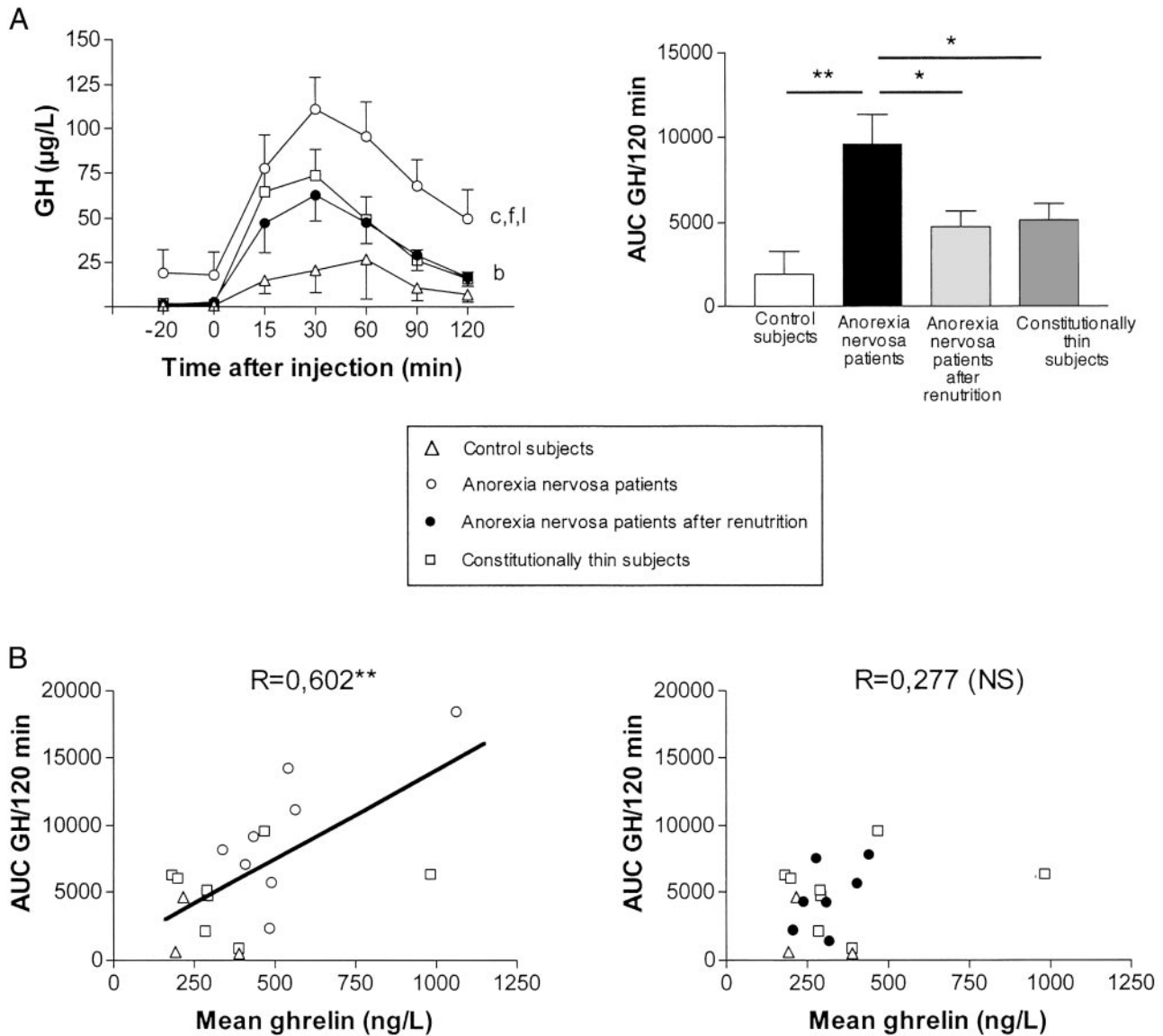


FIG. 4. A, GH response to GHRH in control subjects, AN patients before and after renutrition, and constitutionally thin subjects (symbols are explained in Fig. 1). *Left panel*, Plasma GH levels during 120 min after GHRH administration at 0 min. *Right panel*, AUC of GH 120 min after GHRH stimulation. B, Correlation between AUC of GH 120 min after GHRH and mean 24-h plasma ghrelin levels. *Left panel*, Control women, constitutionally thin subjects, and AN patients. *Right panel*, Control subjects, constitutionally thin subjects, and AN patients after renutrition. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. b, $P < 0.01$; c, $P < 0.001$ (vs. control subjects). f, $P < 0.001$ (vs. constitutionally thin subjects). l, $P < 0.001$ (vs. AN patients after renutrition).

related protein hypothalamic neurons bearing ghrelin and leptin receptors (44, 45). Indeed, although ghrelin activates neuropeptide Y/agouti-related protein neurons (16, 40), leptin inhibits them (46, 47). Furthermore, circulating levels of both hormones are regulated in an opposite manner. In conditions of negative energy balance, such as fasting or AN, leptin is negatively regulated (review in Ref. 48). In contrast, plasma ghrelin levels are reduced and plasma leptin levels are increased in conditions of positive energy balance, such as overfeeding (49) or obesity (50).

If ghrelin behaves as an orexigenic factor, the increase in endogenous ghrelin levels in AN could be considered an adaptive mechanism, promoting energy intake and increasing body fat stores in response to a deficit in energy balance.

Normalization of circulating ghrelin after partial weight recovery is consistent with this hypothesis. In this study ghrelin levels were assayed every 4 h to avoid intensive blood sampling in the patients. Thus, we could not observe the dramatic changes in circulating ghrelin before (increase) and after (decrease) each meal in normal subjects (20). Such pre- and postprandial ghrelin levels may be of great relevance in the control of feeding behavior. However, in AN patients, increased plasma ghrelin levels are not associated with increased food intake. Desensitization of GHS-Rs implicated in the control of food intake could explain in part this paradoxical response. In a first study the GH response to hexarelin, a powerful GHS, was lower in AN than in controls, suggesting a desensitization of the GHS-R implicated in the

GH response (51), but a second study did not confirm these modifications (52). Thus, further experiments are needed to draw conclusions about ghrelin resistance in AN in terms of both feeding and GH control. The two simplest (and not mutually exclusive) hypotheses that can fit with a desensitization of ghrelin receptors involved in feeding behavior in AN, despite the fact that these patients exhibit increased basal GH secretion and GH responses to GHRH, are 1) that ghrelin receptors involved in these two functions are structurally different; and 2) that they are differentially located in the brain and at the periphery. In both cases ghrelin receptors might be differently affected by agonist-induced desensitization. At any rate, therapeutic treatment with ghrelin seems inappropriate in such a psychological disorder.

GH secretion is influenced by modifications of nutritional status, as evidenced by GH deficit in obesity (53) or GH hypersecretion during fasting (54). AN has been associated with high GH levels (8). Most studies investigating the GH response to GHRH in these patients described high GH release after GHRH stimulation (55–57). One study (51) did not show differences between AN and controls, and another study showed time-dependent responses (58). In the present study we also observed an increase in basal and stimulated GH release associated with low IGF-I levels in AN women. Circulating IGF-I levels are nutritionally regulated (59) and decrease acutely with caloric deprivation (60). In AN it has been proposed that high GH levels reflect the altered negative feedback via IGF-I (9), because increased circulating IGF-I after renutrition (2) or injection of recombinant human IGF-I (61) are associated with normalization of GH levels. However, IGF-I is not modified in constitutionally thin women and returns to control values in AN patients after renutrition. Thus, IGF-I modifications cannot explain the enhanced GH response to GHRH in these two groups of subjects compared with controls. Thus, another factor has to be involved in the enhancement of GH secretion. As ghrelin can inhibit somatostatin release centrally (21), it may be postulated that high ghrelin levels induce a low somatostatin-ergic tone that would be responsible for the enhanced GHRH-induced GH response (62, 63).

Plasma cortisol levels were elevated in AN and declined after body weight gain, as previously reported (1, 23). However, cortisol circadian rhythmicity was not altered in AN, with a maximal level at 0800 h and a progressive decrease until midnight in all groups of subjects (23, 34). In contrast with other nychthemeral hormones, cortisol was not modified in constitutional thinness despite an increase in ghrelin levels. These observations suggest that hypercortisolism in AN is related to characteristics other than nutritional status. Experimental hypophagia caused by restraint stress has similarities with AN: both are associated with an increased release of corticotropin-releasing factor (64, 65). Thus, differences between AN and constitutional thinness may reflect differences in emotional status between these two groups (66).

In summary, as previously reported in the rat, endogenous ghrelin in humans is not strictly correlated with basal GH secretion, although it appears to be involved in GHRH-induced secretion. Ghrelin and leptin, two peripheral hormones that signal changes in the energy balance to the central nervous system, are reciprocally modified in AN as well as

in constitutionally thin subjects. This later group, being distinct from AN subjects by both feeding behavior and neuroendocrine parameters, deserves further characterization. Finally, ghrelin is not only dependent on body fat mass, but is also directly influenced by feeding behavior and/or energy intake. This is further pointed out by the closer relationship between T_3 and ghrelin than between T_3 and leptin, suggesting that ghrelin may be a better nutritional indicator.

Acknowledgments

Received April 25, 2002. Accepted September 19, 2002.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Jacques Epelbaum, INSERM, U-549, IFR Broca-Sainte Anne, 2 ter rue d'Alésia, 75014 Paris, France. E-mail: epelbaum@broca.inserm.fr.

This work was supported by INSERM and its ATC Nutrition Section.

References

- Gold PW, Gwirtsman H, Avgerinos PC, Nieman LK, Gallucci WT, Kaye W, Jimerson D, Ebert M, Rittmaster R, Loriaux DL, et al. 1986 Abnormal hypothalamic-pituitary-adrenal function in anorexia nervosa. Pathophysiological mechanisms in underweight and weight-corrected patients. *N Engl J Med* 314:1335–1342
- Counts DR, Gwirtsman H, Carlsson LM, Lesem M, Cutler Jr GB 1992 The effect of anorexia nervosa and refeeding on growth hormone-binding protein, the insulin-like growth factors (IGFs), and the IGF-binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab* 75:762–767
- Kiyohara K, Tamai H, Takaichi Y, Nakagawa T, Kumagai LF 1989 Decreased thyroidal triiodothyronine secretion in patients with anorexia nervosa: influence of weight recovery. *Am J Clin Nutr* 50:767–772
- Mendez JP, Garcia E, Salinas JL, Perez-Palacios G, Ulloa-Aguirre A 1989 Anorexia nervosa: endocrine function during the phases of body weight loss and recovery. *Rev Invest Clin* 41:337–344
- Caillot-Augusseau A, Lafage-Proust MH, Margaillan P, Vergely N, Faure S, Paillet S, Lang F, Alexandre C, Estour B 2000 Weight gain reverses bone turnover and restores circadian variation of bone resorption in anorexic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 52:113–121
- Bisacchi U, Comastri G, Morabito F, Rovescalli A 1966 Aspects of lipid metabolism in constitutional leanness. *Riv Clin Pediatr* 78:515–521
- Paggi A, Di Giovanni N, Natoli A 1975 Study of thyroid function in constitutionally thin subjects. *Boll Soc Ital Biol Sper* 51:1–4
- Scafili L, Coltorti A, Sapio C, Caso G, Contaldo F 1991 Basal metabolism and postprandial thermogenesis in anorexia nervosa and constitutional leanness. *Minerva Endocrinol* 16:43–46
- Stoving RK, Veldhuis JD, Flyvbjerg A, Vinten J, Hangaard J, Koldkjaer OG, Kristiansen J, Hagen C 1999 Jointly amplified basal and pulsatile growth hormone (GH) secretion and increased process irregularity in women with anorexia nervosa: indirect evidence for disruption of feedback regulation within the GH-insulin-like growth factor I axis. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 2056–2063
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberato PA, Rosenblum CL, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Van der Ploeg LH et al. 1996 A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974–977
- 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
- Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K 2000 Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 279:909–913
- Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR 2000 The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141:4325–4328
- Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR 2001 Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50:2540–2547
- Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML 2000 Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908–913
- Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyayama F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda H, 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 neuro-peptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50:227–232

17. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillon WS, Ghatgei MA, Bloom SR 2001 Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5992
18. Peino R, Baldelli R, Rodriguez-Garcia J, Rodriguez-Segade S, Kojima M, Kangawa K, Arvat E, Ghigo E, Dieguez C, Casanueva FF 2000 Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *Eur J Endocrinol* 143:R11–R14
19. Inui A 2001 Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat Rev Neurosci* 2:551–560
20. 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
21. Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, Rio MC, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT 2001 In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 73:54–61
22. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K 2001 Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4753–4758
- 22a. American Psychiatric Association 1994 Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th Ed. Washington, DC: American Psychiatric Association
23. Boyar RM, Hellman LD, Roffwarg H, Katz J, Zumoff B, O'Connor J, Bradlow HL, Fukushima DK 1977 Cortisol secretion and metabolism in anorexia nervosa. *N Engl J Med* 296:190–193
24. Licinio J, Wong ML, Gold PW 1996 The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anorexia nervosa. *Psychiatry Res* 62:75–83
25. Croxson MS, Ibbertson HK 1977 Low serum triiodothyronine (T_3) and hypothyroidism in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 44:167–174
26. Grinspoon S, Gulick T, Askari H, Landt M, Lee K, Anderson E, Ma Z, Vignati L, Bowsher R, Herzog D, Klibanski A 1996 Serum leptin levels in women with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3861–3863
27. Eckert ED, Pomeroy C, Raymond N, Kohler PF, Thuras P, Bowers CY 1998 Leptin in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 83:791–795
28. Starkey TA, Lee RA 1969 Menstruation and fertility in anorexia nervosa. *Am J Obstet Gynecol* 105:374–379
29. Suda AK, Pittman CS, Shimizu T, Chambers Jr JB 1978 The production and metabolism of 3,5,3'-triiodothyronine and 3,3',5-triiodothyronine in normal and fasting subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 47:1311–1319
30. O'Brian JT, Bybee DE, Burman KD, Osburne RC, Ksiazek MR, Wartofsky L, Georges LP 1980 Thyroid hormone homeostasis in states of relative caloric deprivation. *Metabolism* 29:721–727
31. Danforth Jr E, Horton ES, O'Connell M, Sims EA, Burger AG, Ingbar SH, Braverman L, Vagenakis AG 1979 Dietary-induced alterations in thyroid hormone metabolism during overnutrition. *J Clin Invest* 64:1336–1347
32. Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, Tschop M 2001 Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 145:669–673
33. Casanueva FF, Dieguez C, Popovic V, Peino R, Considine RV, Caro JF 1997 Serum immunoreactive leptin concentrations in patients with anorexia nervosa before and after partial weight recovery. *Biochem Mol Med* 60:116–120
34. Herpertz S, Albers N, Wagner R, Pelz B, Kopp W, Mann K, Blum WF, Senf W, Hebebrand J 2000 Longitudinal changes of circadian leptin, insulin and cortisol plasma levels and their correlation during refeeding in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 142:373–379
35. Stoving RK, Vinten J, Handberg A, Ebbesen EN, Hangaard J, Hansen-Nord M, Kristiansen J, Hagen C 1998 Diurnal variation of the serum leptin concentration in patients with anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48:761–768
36. Ferron F, Considine RV, Peino R, Lado IG, Dieguez C, Casanueva FF 1997 Serum leptin concentrations in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa and non-specific eating disorders correlate with the body mass index but are independent of the respective disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46:289–293
37. Mathiak K, Gowin W, Hebebrand J, Ziegler A, Blum WF, Felsenberg D, Lubbert H, Kopp W 1999 Serum leptin levels, body fat deposition, and weight in females with anorexia or bulimia nervosa. *Horm Metab Res* 31:274–277
38. Monteleone P, Di Lieto A, Tortorella A, Longobardi N, Maj M 2000 Circulating leptin in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa or binge-eating disorder: relationship to body weight, eating patterns, psychopathology and endocrine changes. *Psychiatry Res* 94:121–129
39. Nakai Y, Hamagaki S, Kato S, Seino Y, Takagi R, Kurimoto F 1999 Role of leptin in women with eating disorders. *Int J Eat Disord* 26:29–35
40. 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
41. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C 2001 Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24:RC19–RC21
42. Seeley RJ, van Dijk G, Campfield LA, Smith FJ, Burn P, Nelligan JA, Bell SM, Baskin DG, Woods SC, Schwartz MW 1996 Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. *Horm Metab Res* 28:664–668
43. Mistry AM, Swick AG, Romsos DR 1997 Leptin rapidly lowers food intake and elevates metabolic rates in lean and *ob/ob* mice. *J Nutr* 127:2065–2072
44. Willeesen MG, Kristensen P, Romer J 1999 Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70:306–316
45. Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Morgan PJ, Trayhurn P 1996 Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 8:733–735
46. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG 1996 Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98:1101–1106
47. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, et al. 1995 The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377:530–532
48. Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG 2000 Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661–671
49. Kolaczynski JW, Ohannesian JP, Considine RV, Marco CC, Caro JF 1996 Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4162–4165
50. Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML 2001 Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50:707–709
51. Giusti M, Foppiani L, Ponzani P, Cuttita CM, Falivene MR, Valenti S 1997 Hexarelin is a stronger GH-releasing peptide than GHRH in normal cycling women but not in anorexia nervosa. *J Endocrinol Invest* 20:257–263
52. Popovic V, Micic D, Djurovic M, Obradovic S, Casanueva FF, Dieguez C 1997 Absence of desensitization by hexarelin to subsequent GH releasing hormone-mediated GH secretion in patients with anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46:539–543
53. Veldhuis JD, Iranmanesh A, Ho KK, Waters MJ, Johnson ML, Lizarralde G 1991 Dual defects in pulsatile growth hormone secretion and clearance subserve the hypsomatotropism of obesity in man. *J Clin Endocrinol Metab* 72:51–59
54. Hartman ML, Clayton PE, Johnson ML, Celniker A, Perlman AJ, Alberti KG, Thorer MO 1993 A low dose euglycemic infusion of recombinant human insulin-like growth factor I rapidly suppresses fasting-enhanced pulsatile growth hormone secretion in humans. *J Clin Invest* 91:2453–2462
55. Brambilla F, Ferrari E, Cavagnini F, Invitti C, Zanoboni A, Massironi R, Catalano M, Cocchi D, Muller EE 1989 α_2 -Adrenoceptor sensitivity in anorexia nervosa: GH response to clonidine or GHRH stimulation. *Biol Psychiatry* 25:256–264
56. Tamai H, Komaki G, Matsubayashi S, Kobayashi N, Mori K, Nakagawa T, Truong MP, Walter Jr RM, Kumagai LF 1990 Effect of cholinergic muscarinic receptor blockade on human growth hormone (GH)-releasing hormone-(1–44)-induced GH secretion in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 70:738–741
57. Lomeo A, Mazzocchi G, Sessarego P, Torre R, Delmonte P, Giusti M 1989 Growth hormone and prolactin response to growth hormone-releasing in anorexia nervosa. *Recent Prog Med* 80:569–573
58. De Marinis L, Mancini A, Valle D, Tacchino RM, Bianchi A, Gentilella R, Perrelli M, Castagneto M, Gasbarrini G 1998 Evaluation of pre- and post-prandial growth hormone (GH)-releasing hormone-induced GH response in subjects with persistent body weight normalisation after biliopancreatic diversion. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22:1011–1018
59. Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE 1994 Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 15:80–101
60. Clemmons DR, Klibanski A, Underwood LE, McArthur JW, Ridgway EC, Beitins IZ, Van Wyk JJ 1981 Reduction of plasma immunoreactive somatomedin C during fasting in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 53:1247–1250
61. Gianotti L, Pincelli AI, Scacchi M, Rolla M, Bellitti D, Arvat E, Lanfranco F, Torsello A, Ghigo E, Cavagnini F, Muller EE 2000 Effects of recombinant human insulin-like growth factor I administration on spontaneous and growth hormone (GH)-releasing hormone-stimulated GH secretion in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2805–2809
62. Gianotti L, Rolla M, Arvat E, Bellitti D, Valetto MR, Ferdeghini M, Ghigo E, Muller EE 1999 Effect of somatostatin infusion on the somatotrope responsiveness to growth hormone-releasing hormone in patients with anorexia nervosa. *Biol Psychiatry* 45:334–339
63. Stoving RK, Andersen M, Flyvbjerg A, Frystyk J, Hangaard J, Vinten J, Koldkjaer OG, Hagen C 2002 Indirect evidence for decreased hypothalamic somatostatinergic tone in anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)* 56:391–396
64. Hotta M, Shibasaki T, Masuda A, Imaki T, Demura H, Ling N, Shizume K 1986 The responses of plasma adrenocorticotropin and cortisol to corticotropin-releasing hormone (CRH) and cerebrospinal fluid immunoreactive CRH in anorexia nervosa patients. *J Clin Endocrinol Metab* 62:319–324
65. Haas DA, George SR 1988 Single or repeated mild stress increases synthesis and release of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Brain Res* 461:230–237
66. Massoubre C, Lang F, Millot L, Pichon M, Estour B, Pellet J 1998 Are depression and denutrition good predictors of dexamethasone suppression test (DST) in anorexia nervosa. *Eur Psychiatry* 13:411–418

Article 4 : Rubino F, Zizzari P, Tomasetto C, Bluet-Pajot MT, Forgione A, Vix M, Grouselle D, Marescaux J. The role of the small bowel in the regulation of circulating ghrelin levels and food intake in the obese Zucker rat. *Endocrinology*. 2005 Apr;146(4):1745-51

The Role of the Small Bowel in the Regulation of Circulating Ghrelin Levels and Food Intake in the Obese Zucker Rat

Francesco Rubino, Philippe Zizzari, Catherine Tomasetto, Marie-Therese Bluet-Pajot, Antonello Forgione, Michel Vix, Dominique Grouselle, and Jacques Marescaux

Institut de Recherche Contre les Cancers de l'Appareil Digestif-European Institute of Telesurgery (F.R., A.F., M.V., J.M.), Université Louis Pasteur, 67091 Strasbourg, France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 549 (P.Z., M.-T.B.-P., D.G.), 75014 Paris, France; Département de Pathologie Moléculaire (C.T.), Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Unité Propre de Recherche 6520 Centre National de la Recherche Scientifique/Unité 596 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Université Louis Pasteur, 67404 Illkirch, France; and Istituto di Clinica Chirurgica (F.R.), Catholic University, 00168 Rome, Italy

Circulating levels of ghrelin, a stomach peptide that promotes food intake, rise before and fall after meal. We aimed to investigate whether there is an independent contribution of the small bowel to the regulation of ghrelin and appetite. A duodenal-jejunal bypass (DJB) with preservation of normal gastric volume and exposure to nutrients was performed in 12-wk-old obese Zucker ZDF fa/fa rat. Food intake, weight gain, 48-h fasting, and 24-h refeeding levels of total and acylated ghrelin were measured. The DJB was challenged against gastric banding (GB), diet, and a sham operation in matched animals. Normal controls were age-matched Wistar rats, which underwent either DJB or a sham operation. The Zucker obese animals showed a paradoxical increase of acylated ghrelin levels after refeeding (+30% with respect to fasting

levels; $P = 0.001$), an abnormality that was completely reversed only by the DJB (-30% ; $P = 0.01$) but not after GB, diet, or sham operation. In obese rats, the DJB resulted in significantly less food intake and weight gain compared with both GB ($P < 0.05$) and sham operation ($P < 0.01$). In sharp contrast, the DJB did not alter food intake and weight gain in normal rats. The DJB does not physically restrict the flow of food but restores meal-induced suppression of acylated ghrelin and significantly reduces food intake in Zucker obese rats. These findings suggest an independent intestinal contribution to the regulation of the dynamic ghrelin response to eating and the possibility that defective signaling from the proximal bowel could be involved in the pathogenesis of obesity/hyperphagia. (*Endocrinology* 146: 1745–1751, 2005)

OBESITY IS CONSIDERED the disease of the 21st century (1). At present, only bariatric surgery achieves major long-term weight loss (2, 3), possibly by counteracting the compensatory mechanisms that usually undermine the efficacy of nonsurgical strategies.

The Roux-en-Y gastric bypass (RYGB), which is one of the most effective and commonly performed procedures (4), includes reduction of gastric capacity to about 5% of its normal volume and a bypass of 95% of the stomach, the entire duodenum, and part of the jejunum (5, 6). In contrast to pure restrictive operations such as the adjustable gastric banding (AGB) and vertical banded gastroplasty, which simply induce early satiety during a meal (7), the RYGB reduces the number of meals and snacks per day and restricts consumption of calorie-dense foods (7–10). Hence, satiety after RYGB extends well beyond the immediate postprandial period and therefore cannot be explained by gastric restriction alone. Understanding how RYGB prevents compensatory hunger after surgical weight loss may facilitate the development of

new antiobesity drugs and perhaps shed light on the pathophysiology of obesity, which still remains elusive.

In 2002, Cummings *et al.* (11) found remarkably low plasma levels of ghrelin, a circulating orexigen (appetite stimulant), in patients who had undergone weight loss by RYGB, a finding that is in striking contrast with the fact that weight loss induced by dieting, anorexia, or regular physical exercise characteristically results in high levels of circulating ghrelin (11, 12). These authors suggested that ghrelin suppression might explain the loss of hunger after RYGB and possibly contributes to surgically induced weight loss (11). However, the issue is still controversial, as other series reported in the literature showed unchanged or even increased levels of circulating ghrelin in patients undergoing RYGB (13).

Ghrelin is a peptide hormone whose plasma levels increase before meals and decrease after food intake in humans and rodents (14–16). Because ingested nutrients are dominant regulators of ghrelin production (7, 12, 17) and the majority of ghrelin-producing tissue is located in the proximal stomach (18, 19), it has been hypothesized that RYGB disrupts ghrelin regulation by permanently excluding the fundus from contact with nutrients (7, 11, 20). Accordingly, differences in surgical technique, such as leaving behind a larger gastric pouch and an incomplete exclusion of the fundic part of the stomach from contact with the nutrient load,

First Published Online December 29, 2004

Abbreviations: AGB, Adjustable gastric banding; DJB, duodenal-jejunal bypass; GP, gastric banding; RF, refeeding; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass.

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

might explain why RYGB fails to suppress circulating ghrelin levels in some instances (12).

Although this is a plausible hypothesis, it is also entirely possible that changes in circulating ghrelin are the result of signals originating further downstream the gastrointestinal tract, away from the stomach, possibly as the result of the rerouting of food through the bowel according to the RYGB.

To test the hypothesis that intestinal signals are involved in the regulation of ghrelin production, we used a modified RYGB, which leaves the stomach intact and diverts food from the pyloric area directly to the distal jejunum (Fig. 1A). With this duodenal-jejunal bypass (DJB), the entire gastric ghrelin-producing tissue is left in digestive continuity, that is, in contact with nutrients. The operation does not involve any type of vagotomy, which could also influence ghrelin secretion (21, 22). Consequently, any change in circulating ghrelin levels occurring after DJB would be secondary to postgastric signals. Because this model does not impose any mechanical restriction on the flow of food, we also aimed to investigate whether the proximal bowel bypass may *per se* contribute to the control of appetite and weight loss.

Materials and Methods

Animals and chow diet

Male Zucker ZDF *fa/fa* rats aged 10 wk were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Zucker ZDF rats are a widely used animal model of obesity and type 2 diabetes; they are characterized by leptin resistance, insulin resistance, and hyperphagia (22). Normal control animals were age-matched Wistar rats. Both obese animals and normal controls were housed under constant ambient temperature and humidity and in a 12-h light, 12-h dark cycle. All animals had free access to tap water and were *ad libitum* fed with Purina diet 5008 (IPS LTD, London, UK). The study was approved by the Institutional Animal Care Committee of the Institut de Recherche Contre les Cancers de l'Appareil Digestif-European Institute of Telesurgery (Strasbourg, France).

Interventions

Zucker ZDF rats underwent one of DJB, GB, and sham operations. Normal controls underwent either DJB or the sham operation. An additional group of age-matched Zucker rats underwent food restriction to provide a model of diet-induced weight loss.

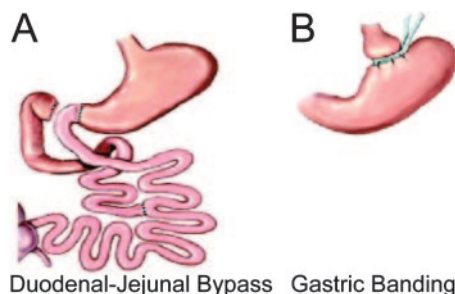


FIG. 1. Surgical operations. A, DJB. The operation excludes the duodenum and jejunum from the flow of food. The length of the bypassed bowel is approximately the same as in standard RYGB in humans, but the DJB does not include bypass or restriction of the stomach. B, The GB operation provides a model of pure gastric restriction by inducing significant mechanical narrowing of the rat's stomach. A nonresorbable inextensible band was placed just below the gastroesophageal junction calibrated to a standard length to provide a similar degree of gastric restriction in all animals.

For all surgical procedures, 12-wk-old rats were fasted overnight and anesthetized with 2% isoflurane and air/oxygen.

DJB. The volume of the stomach was left unperturbed, whereas the entire duodenum and the proximal jejunum were bypassed. This operation is a stomach-sparing bypass that excludes approximately the same amount of foregut excluded in standard RYGB in humans. The length of the bypass was made proportional to human RYGB by measuring the average length of rat intestine, which is approximately 95–100 cm long. The duodenum was separated from the stomach, and the bowel continuity was interrupted at the level of the distal jejunum (10 cm from the ligament of Treitz); the distal of the two limbs was directly connected to the stomach (gastrojejunal anastomosis); the proximal limb carrying the biliopancreatic juices was reconnected downward to the ileum at a distance of 15 cm from the gastrojejunal anastomosis (Roux-en-Y reconstruction). The procedure is illustrated in Fig. 1A.

GB. The proximal stomach was exposed, and a nonresorbable 4-mm-wide band made of polytetrafluoroethylene (BardPTFE Braided Tape; Bard, Tempe, AZ) was placed just below the gastroesophageal junction, in a similar fashion to that usually performed during AGB in humans (23). The band was calibrated to a standard length to provide a similar degree of gastric restriction in all animals undergoing this operation. In addition, the band was fixed to the gastric wall by several nonresorbable stitches (3/0 nylon) to avoid slippage or band migration. The appropriateness of band position and calibration was checked at the time of death to exclude displacement of the band, which would influence results. Although this annular banding is not adjustable as is the AGB, it provides significant mechanical narrowing of the rat's stomach, thus imposing restriction on the flow of food. The operation is illustrated in Fig. 1B.

Sham operation. A gastrotomy was performed at the level of the gastric antrum and closed with an absorbable suture. Furthermore, transections and reanastomosis of the gastrointestinal tract were performed at the level of the duodenum and distal jejunum. The physiological flow of food through the bowel was left intact.

Food intake restriction. After measuring the mean daily food intake for 2 wk in an age-matched and *ad libitum*-fed group of rats, access to food was then restricted to only one third of it for 4 consecutive weeks.

Weight change and food intake monitoring

Weight and food intake were measured daily for the duration of the study.

Sampling for plasma hormone measurements

From the tail of conscious rats, blood was collected in EDTA tubes containing the gastrointestinal preservative Aprotinin. After centrifugation at 3000 rpm and 4°C for 12 min, plasma was immediately separated and stored at -80°C until analysis.

Plasma glucose and hormone measurements (Fig. 2)

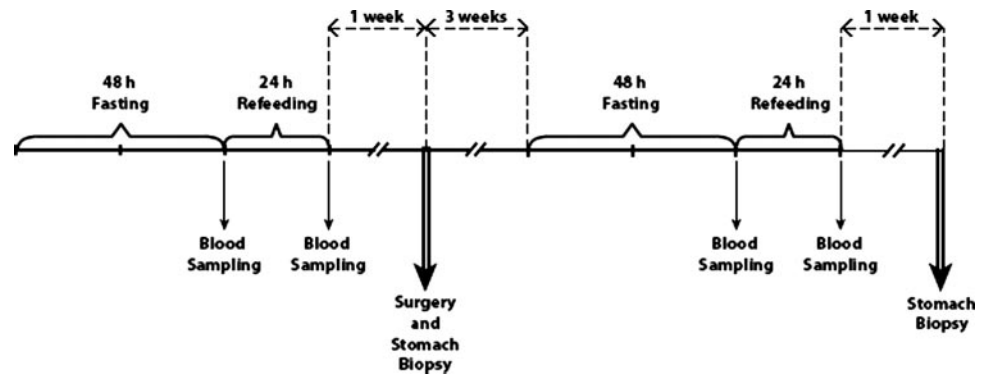
All blood sampling tests were performed between 0900 and 1100 h.

Plasma hormone and glucose levels were measured in both positive and negative energy balance. To induce a negative energy balance, rats were deprived of food but not of water for 48 h before the experiment (48-h fasting). Then, blood samples were obtained again after a 24-h period of refeeding (RF) started at the time the rats had completed the 48-h fasting tests.

Postoperative 48-h fasting and RF tests were performed 3 wk after the operations.

Ghrelin. Plasma levels of total and acylated ghrelin were determined by two laboratory immunoenzymatic assays using polyclonal rabbit antibodies against the C terminus of rat ghrelin (developed at the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France) and N-terminal rat ghrelin (kindly provided by Dr. Hosoda, Osaka, Japan), respectively, and human ghrelin was coupled to acetylcholinesterase (Spibio, Saclay, France) as tracer. The sensitivity was 100 and 20 pg/ml and the intra- and interassay coefficients of variation were 4 and 15%, respectively.

FIG. 2. Study's protocol. The figure illustrates the timing of surgeries and testings.



Leptin and insulin. Plasma leptin and insulin concentrations were determined with RIA kits (Linco Research, St. Charles, MO). The sensitivity was 1 and 0.2 ng/ml, respectively, and the intra- and interassay coefficients of variation were less than 10% (intraassay, 2–4.6 and 1.4–4.6%; interassay, 3–5.7 and 8.5–9.4%, respectively).

Glycemia. Plasma glucose levels were measured by enzymatic test (glucose oxydase; Beckman analyzer II; Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Isolation of RNA and Northern hybridization

A portion of mucosa from the gastric body from each operated rat was taken at the time of and 4 wk after surgery. Surgical biopsies were rapidly frozen in liquid nitrogen. Total RNAs were extracted by the rapid guanidinium isothiocyanate procedure (43). The total RNA was fractionated by electrophoresis on 1% agarose, 2.2 M formaldehyde gels, transferred to nylon membrane (Hybond N; Amersham Corp. Arlington Heights, IL), and immobilized by baking for 2 h at 80 C. RNA loading was visualized by methylene blue staining. Membranes were hybridized at 42 C in 50% formamide, 5× standard saline citrate, 0.4% ficoll, 0.4% polyvinylpyrrolidone, 20 mM sodium phosphate (pH 6.5), 0.5% sodium dodecyl sulfate, 10% dextran sulfate, and 100 μg/ml denatured salmon sperm DNA, for 36–48 h, with the ³²P-labeled specific rat ghrelin probe (GenBank accession no. AB029433) diluted to 0.5–1.10⁶ cpm/ml. Stringent washings were performed at 60 C in 0.1× standard saline citrate and 0.1% sodium dodecyl sulfate. Filters were autoradiographed at –80 C for 12–72 h. The effect of different gastric surgeries on the expression level of ghrelin transcripts in the stomach was measured by Northern blot analysis.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. The changes in food intake, body weight, and plasma ghrelin levels were compared by ANOVA followed by Student's *t* test. Comparisons between groups were performed with the unpaired *t* test. Simple linear regression analysis was used to evaluate correlation between body weight and plasma ghrelin levels. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Effect of DJB on food intake and weight gain (Table 1)

To investigate the effect of the bypass of the foregut on appetite and body weight regulation, we compared food intake and percentage of weight gain in the different groups of rats for a period of 4 wk after surgery.

In obese ZDF rats, the pure mechanical restriction induced by annular GB reduced food intake compared with sham-operated animals (mean daily food intake was 25.1 ± 1.2 *vs.* 30.8 ± 1.2 g/rat, respectively; *P* < 0.05; Fig. 3A). However, the most dramatic effect on food intake was seen in DJB-treated obese Zucker rats, which, despite the intact gastric reservoir, showed a lower daily rate of food intake (19.6 + 1.4 g/rat) than both GB and sham animals (*P* < 0.001) (Fig. 3A). In sharp contrast, DJB did not influence food intake in age-matched Wistar rats as demonstrated by identical average daily rates of food intake between DJB and sham-operated animals during the 4 wk of follow-up (Fig. 3A).

In Zucker rats, the DJB resulted in significantly less weight gain compared with both GB and sham operations (*P* < 0.01; Fig. 3B). In striking contrast, DJB had no effect on control Wistar rats because they showed the same weight gain after DJB or sham surgery (Fig. 3B).

Zucker rats undergoing marked food restriction achieved a decrease in weight gain that was comparable with that of DJB [6.6 ± 0.6 *vs.* 5.2 ± 5.3%, respectively; *P* = not significant (NS)]. Hence, this group of rats was an appropriate control for comparing the hormonal effect of diet-induced weight loss *vs.* surgically induced weight loss.

TABLE 1. Food intake and weight gain

	DJB	Banding	Sham	<i>P</i> value	Diet
Obese rats					
Food intake (g/rat·d)	19.6 ± 1.4	26.1 ± 1.2	30.8 ± 1.2	<0.001	9.0 ± 0.1
% Weight gain	5.2 ± 5.3	19.1 ± 2.7	30.2 ± 3.1	<0.01	6.6 ± 0.6
Body weight (g)					
Final	290 ± 19	329 ± 4	362 ± 21	<0.05	385 ± 15
Preop	286 ± 5	279 ± 7	278 ± 4	ns	362 ± 15
Lean rats					
Food intake (g/rat·d)	29.5 ± 1.3		31.1 ± 0.9	ns	
% Weight gain	34.9 ± 3.1		37.1 ± 5.1	ns	
Body weight (g)					
Final	458 ± 4		476 ± 16	ns	
Preop	340 ± 10		347 ± 3	ns	

ns, Not significant.

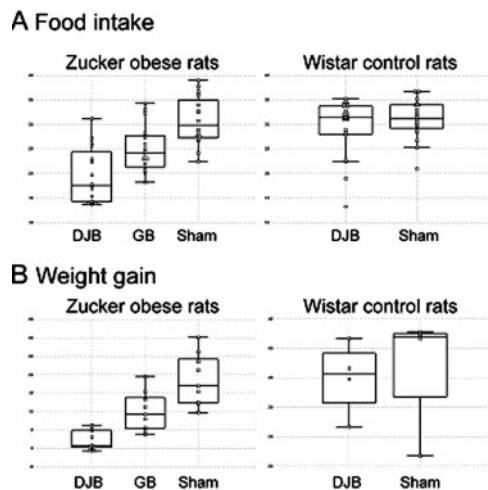


FIG. 3. Food intake and weight gain. A, Effect of DJB on food intake in lean (Wistar) and obese (Zucker) animals. DJB-treated Zucker rats ate significantly less food than GB-treated animals ($P < 0.05$) and sham-operated controls ($P < 0.001$). In contrast, DJB did not have any impact on food intake in Wistar rats, as shown by the fact that DJB-treated rats ate the same amount of food per day compared with sham-operated controls. Food intake is expressed as average daily food intake during the 4 wk of follow-up (grams per rat per day). B, Effect of DJB on weight gain in lean (Wistar) and obese (Zucker) animals. In Zucker rats, the DJB resulted in significant less weight gain compared with both GB ($P < 0.05$) and sham ($P < 0.01$) operations. In striking contrast, lean animals (Wistar) undergoing DJB showed the same weight gain as sham-operated rats. Weight gain is calculated as the percentage of body weight gained from the day of the operation.

Ghrelin mRNA expression

To assess for the integrity of ghrelin-secreting tissue in all rats undergoing surgery, we measured ghrelin mRNA in stomach biopsies obtained at the time of the operation and then again 4 wk after surgery. To ensure that biopsies of gastric mucosa were obtained from the same site at both times, the place of the first biopsy was marked by a stitch of nonresorbable suture.

No change in ghrelin mRNA expression could be detected after any type of surgery in ZDF rats (Fig. 4), demonstrating that all the different gastric surgeries performed in this study preserved the integrity of ghrelin-secreting gastric tissue, without apparent modification of ghrelin gene transcription.

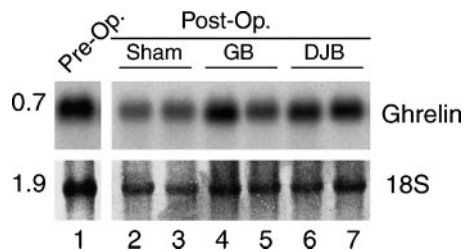


FIG. 4. Expression of ghrelin transcripts by Northern blot analysis of rat's gastric mucosa. The Northern blot contained approximately 10 μ g total RNAs isolated from a nonoperated control rat (lane 1), sham-operated rats (lanes 2 and 3), GB-operated rats (lanes 4 and 5), and DJB-treated rats (lanes 6 and 7). The blot was hybridized using the homologous ppghrelin rat cDNA as a probe. Loading was visualized by the ribosomal 18S staining using methylene blue. RNA sizes are indicated on the left (kilobase pair values).

The effect of energy balance status on circulating ghrelin in obese and normal rats

To investigate ghrelin regulation in normal and obese rats, the effect of negative energy balance (48-h fasting) and positive energy balance (24-h RF) was tested in a group of 12-wk-old nonoperated ZDF rats (16 animals) and in 12-wk-old Wistar rats used as normal controls (16 animals).

Plasma total ghrelin levels were negatively correlated with body weight ($r = -0.69$, $P < 0.001$) and were significantly decreased by RF in each type of animals (lean and obese) (Table 2). However, mean ghrelin concentrations per gram of body weight were higher in obese Zucker rats than in normal Wistar rats (10.4 vs. 7.9 pg/ml·g body weight; $P < 0.05$), consistent with previous reports indicating that the obese Zucker rat is characterized by increased ghrelin mRNA in the stomach and peptide release in the circulation (24).

Although RF slightly reduced acylated ghrelin levels in normal control Wistar rats, the obese Zucker rats showed a paradoxical increase of acylated ghrelin levels after RF (+30% with respect to fasting levels; $P = 0.002$; Fig. 5).

The effect of surgery on circulating ghrelin levels

To investigate the possible role of the bowel in ghrelin regulation, the effect of DJB on total and acylated ghrelin in both fasted and fed states was compared with that of other gastric surgeries.

The experiments showed that DJB does not suppress circulating ghrelin levels in both normal and obese animals. Indeed, in fasting conditions, the Zucker rats that had undergone the DJB showed higher concentration of total and acylated ghrelin compared with sham-operated controls and GB rats as expected for their lower mean body weight. In normal Wistar animals, DJB did not have any impact on ghrelin response to eating. In contrast, DJB restored feeding-induced suppression of acylated ghrelin in the obese Zucker rats (−30% with respect to fasting; $P = 0.01$; Fig. 5), whereas neither the GB nor the sham operation caused significant change in the response of acylated ghrelin to food intake in these animals.

To investigate whether the effect of DJB on the ghrelin response to feeding was a specific outcome of the bypass of the proximal bowel and not secondary to the reduction of

TABLE 2. Plasma glucose and hormones (nonoperated animals)

	48 h Fasting	Refeeding	P value
Obese rats			
Ghrelin (ng/liter)			
Total	3091 \pm 70	2385 \pm 144	<0.01
Acylated	630 \pm 32	824 \pm 49	<0.01
Leptin (mg/liter)	14.0 \pm 0.9 ^a	21.5 \pm 1.1 ^a	<0.01
Insulin (mg/liter)	0.67 \pm 0.07 ^b	7.40 \pm 0.57 ^c	<0.01
Glycemia (mg/dl)	130 \pm 4 ^a	229 \pm 20 ^b	<0.001
Lean rats			
Ghrelin (ng/liter)			
Total	3080 \pm 211	2562 \pm 208	<0.001
Acylated	398 \pm 49	352 \pm 33	ns
Leptin (mg/liter)	0.8 \pm 0.2 ^a	6.3 \pm 0.6 ^a	<0.001
Insulin (mg/liter)	0.22 \pm 0.03 ^b	5.13 \pm 0.86 ^c	<0.01
Glycemia (mg/dl)	96 \pm 4 ^a	148 \pm 6 ^b	<0.001

ns, Not significant.

Obese vs. lean: ^a $P < 0.001$; ^b $P < 0.01$; ^c $P < 0.05$.

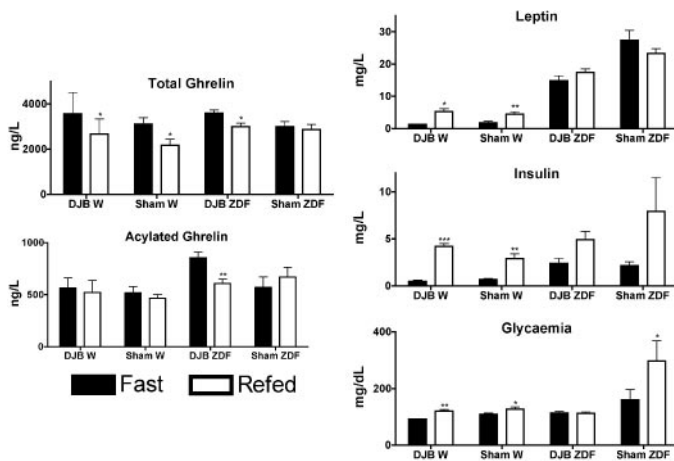


FIG. 5. Ghrelin, leptin, insulin, and glycemia. *Left*, Total ghrelin levels decrease with RF in normal and obese animals. DJB-treated obese ZDF rats showed feeding-induced suppression of acylated ghrelin (-30% with respect to fasting; $^*P = 0.01$), whereas sham-operated ZDF rats maintained the paradoxical increase of acylated ghrelin with feeding. *Right*, Zucker ZDF rats are leptin resistant and show higher plasma leptin levels compared with Wistar rat. In Wistar rats, RF significantly increased leptin levels. In Zucker ZDF rats, there were no significant differences in leptin levels between the fasted and fed states; however, unlike sham-operated animals, the DJB-treated rats showed a trend toward increased levels of leptin with RF. Zucker ZDF rats had higher insulin levels than normal Wistar rats in both fasting and fed conditions. DJB-treated ZDF rats had lower levels of insulin compared with sham-operated animals; however, this difference does not reach statistical significance when considering the insulin to body weight ratio. Zucker ZDF rats have type 2 diabetes. Zucker DJB-treated animals had lower plasma glucose levels compared with sham-operated rats, especially in the fed condition. Remarkably, plasma glucose levels of Zucker rats treated by DJB were comparable with those of nondiabetic animals (Wistar rats). W, Wistar; ZDF, Zucker obese diabetic rats; $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$.

weight gain induced by the procedure, we tested the effect of diet-induced weight loss on circulating ghrelin in a group of matched Zucker rats undergoing food restriction for 4 wk. Despite a similar degree of weight gain compared with DJB rats, the diet group maintained the paradoxical increase of acylated ghrelin in response to feeding (330 ± 9 vs. 218 ± 23 pg/ml; $P < 0.01$).

The effect of surgery on leptin and insulin (Table 2 and Fig. 5)

To evaluate the effect of DJB on the secretion of long-term satiety hormones, we measured leptin and insulin levels in fasted and fed condition. Plasma leptin levels were significantly higher in obese Zucker rats compared with normal Wistar animals in both fasted and fed conditions.

The obese Zucker rats who had undergone DJB had significantly lower levels of plasma leptin compared with sham-operated animals and nonoperated controls; however, this difference disappears when considering the ratio of leptin to body weight (0.062 ± 0.003 vs. 0.066 ± 0.003 vs. 0.062 ± 0.007 ng/ml·g body weight, respectively; $P = \text{NS}$). Furthermore, there was no difference in leptin levels in these rats after DJB- or diet-induced weight loss, suggesting that there was no direct impact of DJB on leptin secretion.

As expected, ZDF rats had higher plasma insulin levels

than normal Wistar animals in both fasting and fed conditions (Fig. 5). Furthermore, in both obese animals and normal controls, RF after 48 h fasting significantly increased plasma insulin levels. DJB-treated ZDF rats had lower levels of insulin compared with sham-operated animals; however, this difference does not reach statistical significance when considering the insulin to body weight ratio.

The effect of DJB on type 2 diabetes

To investigate the effect of DJB on type 2 diabetes in the Zucker ZDF obese diabetic model, we tested plasma glucose in the fasted and fed states. The diabetic rats that had undergone DJB showed plasma glucose levels comparable with nondiabetic controls in both fasted and fed conditions. Sham-operated ZDF animals instead showed significantly higher glycemia, particularly in the fed state (Fig. 5).

Discussion

Ghrelin is a 28-amino-acid residue peptide predominantly produced by enteroendocrine cells in the oxyntic mucosa of the stomach (18, 19, 26). The acylation of one of its serine residues seems to have importance for its endocrine actions (27, 28), but the unacylated form has also been shown to possess metabolic effects (29). In both humans and rodents, ghrelin levels are increased by food deprivation and are decreased postprandially (14–16). However, how ingested nutrients interact with the ghrelin-producing cells is unclear.

Consistently with previous reports (30), this study found that, in obese Zucker rats, RF is associated with a paradoxical 30% increase of acylated ghrelin levels over fasting concentrations, suggesting that these obese animals are resistant to the meal-induced decrease of circulating acylated ghrelin. English *et al.* (31) reported that food intake fails to suppress plasma ghrelin levels also in obese humans. This altered endocrine response to eating in obese subjects may contribute to overeating and have implications for antiobesity therapies. Indeed, interventions in the dynamic response of ghrelin to eating, which seems to be altered in rodent and human obese subjects, may be a more effective way to fight obesity.

It has been suggested that RYGB may induce satiety and weight loss through suppression of circulating ghrelin levels (11) and that the mechanism responsible for the effect on ghrelin is the exclusion of the fundus and the isolation of ghrelin-producing cells from direct contact with ingested nutrients (11, 12, 20). However, this explanation is counter-intuitive because an empty stomach is usually associated with increased ghrelin levels. We speculated that the rerouting of food through the bowel characteristic of the RYGB may influence ghrelin and appetite independently on fundus exclusion. The rationale for this hypothesis is that ghrelin-secreting cells in the stomach exist in both open and closed types (33), suggesting that they can receive both luminal and neuroendocrine information. Furthermore, recently published experiments put forward the possibility of a postgastric regulation of ghrelin secretion (34).

Unlike the standard RYGB, the DJB that we used in this study is an ideal model to test the hypothesis of an independent intestinal contribution to the regulation of circulat-

ing ghrelin levels because it allows one to rule out that any change in ghrelin and/or appetite is related to gastric exclusion/restriction.

Consistent with earlier reports showing no suppression in basal ghrelin levels in humans after RYGB (13), we did not observe suppression of mean total ghrelin levels after DJB. However, in obese Zucker rats, the operation reversed the altered response of circulating acylated ghrelin to feeding. The specificity of this result is demonstrated by the lack of such an effect in GB-treated and sham-operated Zucker rats as well as in the group undergoing diet. These findings support the hypothesis that intestinal signals contribute to the regulation (or dysregulation) of ghrelin secretion. It is possible that DJB influences ghrelin regulation by causing variations in gut hormone peptide YY (PYY) secretion, but other factors may also play a role (*i.e.* unknown peptides or neural signals from the bowel). Further exploration is necessary to understand how exactly the bowel influences ghrelin regulation.

The effect of DJB on appetite was also noteworthy. In this study, DJB decreased food intake in obese Zucker rats even more than GB, which is a pure restrictive procedure. The theoretical possibility that this effect could be determined by stenosis at the level of the gastrointestinal anastomosis is discounted by the fact that DJB-treated Wistar rats showed the same food intake rates compared with sham-operated controls. Furthermore, obese Zucker rats undergoing DJB still showed the ability to slightly increase their mean daily food intake with growth, a possibility that would be negated by the presence of significant stenosis.

The decreased food intake after the DJB may depend on the increase or enhancement of a factor inducing satiety and/or the reduction or inhibition of an antisatiety signal.

The lack of effect of DJB on food intake in normal Wistar rats, in sharp contrast with what is seen in obese animals, suggests that the second hypothesis is more likely. Previous work from our group showed that DJB does not reduce food intake in Goto-Kakizaki diabetic rats (35), which, like the Wistar rats used in the present study, are nonobese. Altogether, these observations suggest that the DJB may offset an abnormal signal produced by the bowel of hyperphagic/obese animals but not by the intestine of normal and lean rats. This implies the possibility that the gut plays an important role in the pathophysiology of hyperphagia and obesity. We speculate that failure to suppress an orexigenic signal originating in the bowel could result in persistence of the drive to eat even in the setting of positive energy balance, leading to excess energy storage and obesity. Our experiments and the clinical evidence that the most effective surgical operations in maintaining long-term weight loss are those that include a bypass of the foregut (biliopancreatic diversion and RYGB) (36) support the view of obesity as a disease of the bowel.

In this study, the DJB greatly reduced plasma glucose levels in obese diabetic Zucker rats, consistent with the knowledge that RYGB induces remission of type 2 diabetes in the majority of morbidly obese humans (37, 38). A recent study by two of us (F.R. and J.M.) demonstrated that this surgical control of diabetes depends on the bypass of the duodenal-jejunal tract, as shown by the fact that DJB (the

same model used in the present study) controls type 2 diabetes in nonobese diabetic rats (Goto-Kakizaki rats), independently of caloric intake and weight loss (35).

Finally, our findings challenge the opinion that RYGB is primarily a restrictive operation (39, 40) and support an endocrine mechanism of action of the procedure (7, 41). Although it is generally believed that the small size of the gastric pouch is essential to reduce caloric intake and guarantee the weight loss effect of RYGB (39, 40, 42), our study suggests that performing an extremely small gastric pouch might be unnecessary. Certainly, a better understanding of the mechanism of action of RYGB is a priority because it may improve the design of bariatric operations.

In summary, our experiments demonstrate that the DJB, an experimental model of proximal bowel bypass with full preservation of the stomach, restores meal-induced suppression of acylated ghrelin and reduces food intake and weight gain in obese Zucker rats. Intriguingly, the operation does not alter food intake in normal Wistar animals. Altogether, these results indicate an intestinal contribution to the regulation of the dynamic ghrelin response to eating and suggest that an abnormal signaling from the proximal bowel may be involved in the pathogenesis of hyperphagia and obesity. Our experimental model, the DJB, may be useful to investigate intestinal factors regulating ghrelin secretion and appetite in the attempt to identify new targets for the development of antiobesity drugs.

Acknowledgments

The authors thank C. Wendling for technical assistance.

Received September 3, 2004. Accepted December 20, 2004.

Address all correspondence and requests for reprints to: Francesco Rubino, M.D., Institut de Recherche Contre les Cancers de l'Appareil Digestif-European Institute of Telesurgery, 1 Place de l'Hopital, 67091 Strasbourg, France. E-mail: f.rubino@lycos.com.

The authors thank ATC Nutrition for financial support.

Results from this work were presented at the Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, New Orleans, Louisiana, May 15–20, 2004.

References

- Kopelman PG 2000 Obesity as a medical problem. *Nature* 404:635–643
- Brolin RE 2002 Bariatric surgery and long-term control of morbid obesity. *JAMA* 288:2793–2796
- Mun EC, Blackburn GL, Matthews JB 2001 Current status of medical and surgical therapy for obesity. *Gastroenterology* 120:669–681
- NIH Consensus Development Panel 1991 Gastrointestinal surgery for severe obesity. *Ann Intern Med* 115:956–961
- Schauer PR, Ikramuddin S 2001 Laparoscopic surgery for morbid obesity. *Surg Clin North Am* 81:1145–1179
- Jacob BP, Gagner M 2003 New developments in gastric bypass procedures and physiological mechanisms. *Surg Technol Int* 11:119–126
- Cummings DE, Overduin J, Foster-Schubert KE 2004 Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2608–2615
- Brolin RL, Robertson LB, Kenler HA, Cody RP 1994 Weight loss and dietary intake after vertical banded gastroplasty and Roux-en-Y gastric bypass. *Ann Surg* 220:782–790
- Kenler HA, Brolin RE, Cody RP 1990 Changes in eating behavior after horizontal gastroplasty and Roux-en-Y gastric bypass. *Am J Clin Nutr* 52:87–92
- Halmi KA, Mason E, Falk JR, Stunkard A 1981 Appetitive behavior after gastric bypass for obesity. *Int J Obes* 5:457–464
- Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ 2002 Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 346:1623–1630
- Cummings DE, Shannon MH 2003 Roles for ghrelin in the regulation of appetite and body weight. *Arch Surg* 138:389–396

13. Faraj M, Havel PJ, Phelis S, Blank D, Sniderman AD, Cianflone K 2003 Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1594–1602
14. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML 2000 Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908–913
15. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C 2001 Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24:RC19–RC21
16. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Niiijima A, Fujino MA, Kasuga M 2001 Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120:337–345
17. Shiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S 2002 Plasma ghrelin levels in normal and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 87:240–244
18. Tomasetto C, Karam SM, Ribieras S, Masson R, Lefebvre O, Staub A, Alexander G, Chenard MP, Rio MC 2000 Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: the motilin-related peptide. *Gastroenterology* 119:395–405
19. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T *et al* 2001 Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4753–4758
20. Fruhbeck G, Diez-Caballero A, Gil MJ, *et al* 2004 The decrease in plasma ghrelin concentrations following bariatric surgery depends on the functional integrity of the fundus. *Obes Surg* 14:606–612
21. Date Y, Murakami N, Toshinai K, *et al* 2002 The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123:1120–1128
22. Williams DL, Grill HJ, Cummings DE, Kaplan JM 2003 Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology* 144:5184–5187
23. Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF 1992 The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. *Hypertension* 19(Suppl 1):I110–I115
24. Chapman AE, Kiroff G, Game P, Foster B, O'Brien P, Ham J, Maddern GJ 2004 Laparoscopic adjustable gastric banding in the treatment of obesity: a systematic literature review. *Surgery* 135:326–351
25. Beck B, Richey S, Stricker-Krongrad A 2003 Ghrelin and body weight regulation in the obese Zucker rat in relation to feeding state and dark/light cycle. *Exp Biol Med* 228:1124–1131
26. 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
27. Matsumoto M, Hosoda H, Kitajima Y, Morozumi N, Minamitake Y, Tanaka S, Matsuo H, Kojima M, Hayashi Y, Kangawa K 2001 Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 14:287:142–146.
28. 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
29. Gauna C, Meyler FM, Janssen JA, Delhanty PJ, Aribat T, van Koetsveld P, Hofland LJ, Broglio F, Ghigo E, van der Lely AJ 2004 Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5035–5042
30. Ariyasu H, Takaya K, Hosoda H, Iwakura H, Ebihara K, Mori K, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K 2002 Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the acylated form of ghrelin. *Endocrinology* 143:3341–3350
31. English PJ, Ghatei MA, Malik IA, Bloom SR, Wilding JP 2002 Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2984
32. Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML 2001 Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50:707–709
33. Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T 2002 Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 23:531–536
34. Williams DL, Cummings DE, Grill HJ, Kaplan JM 2003 Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback. *Endocrinology* 144:2765–2767
35. Rubino F, Marescaux J 2004 Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes: a new perspective for an old disease. *Ann Surg* 239:1–11
36. Buchwald H 2002 A bariatric surgery algorithm. *Obes Surg* 12:733–746
37. Rubino F, Gagner M 2002 Potential of surgery for curing type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg* 236:554–559
38. Pories WJ, Swanson MS, MacDonald KG, Long SB, Morris PG, Brown BM, Barakat HA, deRamon RA, Israel G, Dolezal JM 1995 Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann Surg* 222:339–350
39. Fobi MA, Lee H 1994 SILASTIC ring vertical banded gastric bypass for the treatment of obesity: two years of follow-up in 84 patients. *J Natl Med Assoc* 86:432
40. Capella JF, Capella RF 2002 An assessment of vertical banded gastroplasty-Roux-en-Y gastric bypass for the treatment of morbid obesity. *Am J Surg* 183:117–123
41. Rubino F, Gagner M, Gentileschi P, Kini S, Fukuyama S, Feng J, Diamond E 2004 The early effect of the Roux-en-Y gastric bypass on hormones involved in body weight regulation and glucose metabolism. *Ann Surg* 240:236–242
42. MacNormal LD, Rhode BM, Nohr CW 2000 Late outcome of isolated gastric bypass. *Ann Surg* 231:524–528
43. Chomczynski P, Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

Ⓐ Ghreline totale dosée par RIA chez le rat

	Témoins GC (5)	GC (5)	Témoins HypoX (5)	HypoX (5)
Ghreline totale pg/ml	1753±185	1105±196 * vs T	1375±150	810±130 * vs T
GH ng/ml	35±9	1474± 353 *** vs T	42±18	ind

Ⓑ Ghreline totale dosée par RIA chez l'homme (patients du Dr Estour, St Etienne)

	Témoins	Acromégales
Hommes et femmes de 30 à 70 ans	1573±128 n=20	741±124 *** vs T n=8
Femmes de 40 à 60 ans	1696±172 n=10	575±75 *** vs T n=4

Ⓒ Ghreline octanoylée chez des rattes hypersécrétantes GH (GC)

	Témoins (5)	GC (6)
Ghreline octanoylée pg/ml	1889 ± 528	6356 ± 953 ** vs T
GH ng/ml	10 ± 1	8217 ±1088 *** vs T

Figure 7R : Variation des taux de ghreline plasmatique en fonction du statut en hormone de croissance

Nos résultats et les nombreuses données de la littérature suggèrent que la ghreline pourrait être un élément clé d'un réseau central complexe qui régule la sécrétion de GH, la prise alimentaire et la dépense énergétique et qui de ce fait contribue à la régulation de la croissance corporelle. (Bluet-Pajot *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2003; Tolle *et al.*, 2002; Tschop *et al.*, 2001; Wren *et al.*, 2001). Dans la deuxième partie de ce travail nous nous sommes demandés si en retour ces différents facteurs étaient capables de réguler la sécrétion de ghreline ce qui nous a conduit à étudier les variations des taux plasmatiques de cette hormone dans des situations où la sécrétion de GH et/ou l'état nutritionnel sont modifiés

I) Ghreline et hormone de croissance

Ghreline et GH jouent un rôle important dans la régulation de la balance énergétique. Néanmoins la ghreline favorise l'oxydation du glucose et la lipogenèse (Wren *et al.*, 2001) alors que la GH favorise la production de glucose et la lipolyse (Moller *et al.*, 1991; Ottosson *et al.*, 1995). Or la ghreline est un puissant stimulant de la sécrétion de GH. Est ce qu'en retour la GH exerce une action négative sur la sécrétion de ghreline ? Pour tenter de répondre à cette question nous avons évalué les taux de ghreline, chez le rat, dans des situations où la sécrétion de GH est très faible (rattes hypophysectomisées avec des taux de GH indétectables) ou au contraire très élevée (rattes Wistar Furth implantées en SC avec des cellules GC, cellules qui ne sécrètent que de la GH et qui vont générer une tumeur sous cutanée entraînant des taux circulants très élevés de GH). Nous avons également déterminé les taux de ghreline chez l'Homme, chez des patients acromégales qui présentent des taux circulants de GH très importants.

Dans un premier temps les taux de ghreline totale évalués par RIA étaient significativement abaissés aussi bien chez la ratte hypophysectomisée (810 ± 130 vs 1375 ± 150 pg/ml ; $P < 0,05$) que chez la ratte hypersécrétante (718 ± 119 vs 1481 ± 324 ; $P = 0,0524$). (figure 7RA). Utilisant le même dosage nous avons également observé une diminution des taux de ghreline totale chez des patients acromégales (figure 7RB).

Le récepteur de l'hormone de croissance est présent au niveau de l'estomac (Delehaye-Zervas *et al.*, 1994; Lobie *et al.*, 1990) et il était légitime de penser que la GH pourrait moduler la libération de ghreline à ce niveau soit par une action directe si le récepteur

est présent sur les cellules la synthétisant soit par une action indirecte via par exemple la somatostatine puisque d'une part la GH est capable d'augmenter la sécrétion de somatostatine (Kasanuki *et al.*, 1981) et que d'autre part la somatostatine inhibe la sécrétion de ghreline (Silva *et al.*, 2005).

Ces résultats très préliminaires et contradictoires ainsi que les nombreuses données de la littérature ne permettent pas actuellement de répondre à la question posée. Ceci tient en grande partie aux modèles utilisés, modèles dans lesquels outre la GH d'autres facteurs impliqués dans la régulation de la sécrétion de ghreline sont altérés.

Les résultats que nous avons obtenus chez la ratte hypophysectomisée sont opposés à ceux rapportés par une autre étude (Tschop *et al.*, 2002), néanmoins les sexes et les souches sont différents dans les 2 études. De plus nous savons maintenant que le modèle hypophysectomisé n'est pas un bon modèle dans ce cas. En effet ces animaux présentent, entre autres, une diminution de la glycémie et de l'insulinémie (Gause *et al.*, 1985; Son *et al.*, 2000) et une diminution de l'expression de la leptine au niveau de la graisse (Boni-Schnetzler *et al.*, 1996), or tous ces facteurs semblent capables de moduler la libération de ghreline (Broglio *et al.*, 2003; Rauma *et al.*, 2006; Tsubone *et al.*, 2005). Les résultats obtenus avec d'autres modèles d'animaux déficients en GH ,rats Dwarf avec une mutation autosomale récessive du gène de la GH, souris KO protéines Gq/11, souris avec une mutation missense de la GH, sont eux aussi contradictoires : pas de modification ou une diminution sont observées dans le premier modèle (Caminos *et al.*, 2002; Tschop *et al.*, 2002), une augmentation dans les 2 derniers modèles (Meyer *et al.*, 2004; Wettschureck *et al.*, 2005). Néanmoins là encore d'autres facteurs peuvent rendre compte de ces résultats. Il a par exemple été montré que chez le rat Sprague Dawley nain les taux de leptine étaient augmentés (Ishikawa *et al.*, 2001).

Chez l'homme les résultats obtenus chez des patients déficients en GH diffèrent également d'une étude à l'autre : les taux de ghreline totale ne sont pas modifiés (Janssen *et al.*, 2001; Jarkovska *et al.*, 2006; Malik *et al.*, 2004) ou sont diminués (Giavoli *et al.*, 2004). Dans une autre étude un traitement substitutif par l'hormone de croissance de ces patients entraîne une diminution des taux de ghreline totale (Eden Engstrom *et al.*, 2003). Néanmoins chez ces patients, d'autres facteurs sont également modifiés par le traitement, comme le taux d'insuline qui est augmenté, ce qui pourrait expliquer la diminution de ghreline observée.

Le même problème se pose avec des animaux ou des patients hypersécrétant la GH qui ont, entre autres une augmentation des taux d'insuline (Freda *et al.*, 2003; Mounier *et al.*, 1995).

II) Ghreline et état nutritionnel

Ces dernières années, l'augmentation incessante du nombre de sujets ayant un comportement alimentaire anormal dont découlent de nombreuses conséquences pathologiques constitue un problème majeur pour notre société. Comprendre les mécanismes biologiques qui régulent la sensation de faim et de satiété représente donc un enjeu important et devrait permettre d'améliorer les traitements de pathologies complexes comme l'anorexie mentale et l'obésité. La ghreline, seule hormone orexigénique périphérique connue à ce jour, a donc suscité immédiatement un grand intérêt. Son implication dans la régulation du comportement alimentaire et du métabolisme énergétique observée chez l'homme et les rongeurs a conduit à faire l'hypothèse que, dans le cas de modification de l'état nutritionnel, due notamment à des troubles du comportement alimentaire, sa sécrétion et donc sa régulation pouvaient être altérées.

Au cours de cette thèse nous avons

- d'une part évalué la sécrétion de ghreline dans un état de dénutrition, conséquence de troubles du comportement alimentaire chez des patientes anorexiques et cherché à identifier des facteurs dont les modifications pourraient être corrélées avec celles des taux de ghreline.
- d'autre part comparé les effets de différentes chirurgies bariatriques sur les taux de ghreline et le comportement alimentaire chez le rat obèse afin de localiser l'origine de facteurs pouvant être responsables d'une dysrégulation de la sécrétion de ghreline

A) Taux de ghreline chez des patientes anorexiques

L'anorexie mentale et la boulimie se caractérisent par des comportements alimentaires aberrants et des stratégies extrêmes de contrôle du poids conduisant à une dénutrition, des complications métaboliques et des anomalies hormonales. Ces pathologies affectent principalement les jeunes femmes, sont chroniques et grevés d'un taux de mortalité élevé (Gotestam *et al.*, 1995).

Les taux de ghreline totale ont été mesurés au cours du cycle nyctéméral chez des patientes anorexiques avant et après renutrition et comparés à ceux obtenus chez des jeunes femmes de même âge dites « maigreurs constitutionnelles ». Ces dernières ont un index de masse corporelle (IMC) comparable à celui des anorexiques mais elles ne présentent pas de trouble du comportement alimentaire (leur taux de T3 marqueur de l'état nutritionnel est normal) et elles ont un pourcentage de masse grasse normal.

Les résultats présentés dans l'article 3 montrent que si chez l'anorexique, le rythme circadien de sécrétion de la ghreline persiste (à savoir augmentation des taux plasmatiques de ghreline tout au long de la journée pour atteindre un maximum à 1h00 puis diminuer durant le reste de la nuit) les taux de l'hormone sont plus élevés tout au long du nyctémère comparés à ceux observés chez des témoins de même âge et de même sexe et se normalisent après renutrition. Toutefois l'intervalle entre les prélèvements (4 heures) ne nous permet pas de mettre en évidence l'existence ou non des variations associées aux repas comme décrites par Cummings (Cummings *et al.*, 2001). Contrairement à ceux de ghreline, les taux de leptine sont fortement diminués chez les patientes anorexiques et les variations du rythme circadien sont totalement abolies comme précédemment rapporté par d'autres auteurs (Balligand *et al.*, 1998; Herpertz *et al.*, 2000; Stoving *et al.*, 1998). Taux de ghreline et taux de leptine sont, respectivement, globalement corrélés négativement et positivement à la masse grasse corporelle suggérant que comme la leptine, la ghreline pourrait être un signal d'adiposité. Néanmoins chez les maigreurs constitutionnelles, les taux de ghreline présentent des valeurs intermédiaires et significativement différentes de celles des patientes anorexiques d'une part, des témoins d'autre part indiquant que ces taux dépendent aussi de l'apport calorique. Malgré un BMI équivalent à celui des patientes anorexiques les maigreurs constitutionnelles ne présentent pas de déficit calorique comme l'indiquent leurs taux normaux de T3 libre. Par ailleurs chez l'anorexique il existe une excellente corrélation ghreline/T3 avant et après renutrition, par contre la corrélation leptine /T3 est moins bonne avant renutrition et disparaît après. Ses résultats montrent donc que les taux de ghreline dépendent surtout du comportement alimentaire et/ou de la prise énergétique contrairement à ceux de leptine qui sont plus sous la dépendance de la masse grasse.

B) Régulation des taux circulants de ghreline chez le rat obèse

L'obésité touche plus de 300 millions de personnes et représente donc un fléau mondial

Une personne souffrant d'obésité court plusieurs risques :

- physique : diabète, hypertension, apnée du sommeil, problèmes articulaires etc... .
- psychologique : dépression, mal-être, complexes, inhibition, rejet de son corps
- social : discrimination, mise à l'écart

Actuellement seule la chirurgie bariatrique peut permettre d'obtenir une perte de poids à long terme. Il existe divers procédés chirurgicaux qui ont pour but, soit de diminuer la capacité de l'estomac, soit de court-circuiter une grande partie de la zone intestinale où sont absorbés les aliments.

De façon intéressante le « bypass » gastrique Roux-en-Y, qui consiste à court-circuiter 95% de l'estomac, le duodénum et une partie de l'intestin grêle, réduit le nombre de repas mais aussi la consommation de nourriture riche en calories. Comprendre les mécanismes qui induisent cette satiété qui s'étend au-delà de la période postprandiale et ne peut s'expliquer par la seule restriction gastrique pourrait permettre d'envisager le développement de nouvelles drogues anti obésité.

Est-ce que la ghreline pourrait être impliquée ? Chez le sujet obèse les taux de ghreline circulante sont très bas (Cummings *et al.*, 2002). Après perte de poids suite à un régime alimentaire ou à des exercices physiques réguliers ces taux augmentent alors que suite à une intervention de type « bypass » ils restent bas ou augmentent selon les études. La sécrétion de ghreline est régulée, entre autres, par les nutriments ingérés. Les cellules produisant la ghreline sont localisées dans l'estomac proximal et après « bypass » l'exclusion complète ou incomplète de ces cellules du contact avec les nutriments peut expliquer la divergence des résultats obtenus quant aux taux de ghreline. Dans le cas d'exclusion complète des taux de ghreline très bas pourraient rendre compte de la diminution de sensation de faim après bypass et peut être contribuer à la perte de poids.

Il ne peut être exclu que la ghreline soit aussi régulée par des signaux en provenance de l'intestin. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons pratiqué un « bypass » du duodénum et du jejunum proximal, l'estomac restant intact, chez des rats obèses Zucker et contrôles Wistar. Les effets de cette chirurgie ont été comparés à ceux obtenus après une chirurgie purement restrictive : pose d'un anneau gastrique.

Les résultats sont présentés et discutés dans l'article 4.

En résumé, chez le rat Zucker l'augmentation paradoxale des taux de ghreline octanoylée observée lors d'une renutrition après 48 heures de jeûne est supprimée uniquement par le « bypass » duodéno-jéjunal (mais ni après pose d'anneau gastrique, ni après restriction calorique). Chez le rat Zucker le bypass duodeno-jejunal entraîne une diminution de la prise alimentaire et du gain de masse corporelle. Par contre il est sans effet chez le rat Wistar.

Ces résultats suggèrent que des signaux originaires de l'intestin contribuent à la régulation de la sécrétion de ghreline suite à l'ingestion de nutriments et qu'une dérégulation ou une défectuosité de ces signaux pourraient être impliquée dans l'hyperphagie

En conclusion nos résultats ne nous permettent pas de conclure quant à une régulation de la sécrétion de ghreline par l'hormone de croissance. Par contre ils montrent que les taux de ghreline, contrairement à ceux de leptine, dépendent plus de l'état nutritionnel que de la masse grasse et pourraient être, entre autres, sous la dépendance de signaux générés par l'intestin lors de l'ingestion de nutriments.

3^{ème} partie

Ghreline et obestatine

Article 5 : Zizzari P., Longchamps R., Epelbaum J., Bluet-Pajot M.T. Obestatin partially affect ghrelin stimulation of food intake and GH secretion in rodents. A paraître dans Endocrinology.

Article 5 : Zizzari P., Longchamps R., Epelbaum J., Bluet-Pajot M.T. Obestatin partially affect ghrelin stimulation of food intake and GH secretion in rodents. A paraître dans Endocrinology.

Title:

OBESTATIN PARTIALLY AFFECTS GHRELIN STIMULATION OF FOOD INTAKE AND GH SECRETION IN RODENTS

Short title:

Obestatin, food intake and GH secretion

Authors:

PHILIPPE ZIZZARI , ROMAIN LONGCHAMPS, JACQUES EPELBAUM, MARIE THERESE BLUET-PAJOT.

Key words:

Obestatin, Ghrelin, GH, food intake, mouse, rat

Affiliations:

UMR. 549 INSERM ; Faculté de Médecine ; Université Paris-Descartes ; IFR Broca-Ste Anne, 2ter rue d'Alésia, 75014, Paris France

Corresponding author:

PHILIPPE ZIZZARI
UMR 549 INSERM
2ter rue d'Alésia, 75014
Paris, France
Tel: (33) 01 40 78 92 75
Fax: (33) 01 45 80 72 93
E-mail: philippe.zizzari@broca.inserm.fr

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to disclose

Abstract:

Administration of ghrelin, an endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor 1a (GHSR 1a), induces potent stimulating effects on GH secretion and food intake. However, more than seven years after its discovery, the role of endogenous ghrelin remains elusive. Recently a second peptide, obestatin, also generated from proteolytic cleavage of preproghrelin has been identified. This peptide inhibits food intake and gastrointestinal motility but does not modify *in vitro* GH release from pituitary cells. In this study we have reinvestigated obestatin functions by measuring plasma ghrelin and obestatin levels in a period of spontaneous feeding in ad libitum fed and 24h-fasted mice. While fasting resulted in elevated ghrelin levels, obestatin levels were significantly reduced. Exogenous obestatin *per se* did not modify food intake in fasted and fed mice. However, it inhibited ghrelin orexigenic effect that were evident in fed mice only. The effects of obestatin on GH secretion were monitored in superfused pituitary explants and in freely moving rats. Obestatin was only effective *in vivo* to inhibit ghrelin stimulation of GH levels. Finally, the relationship between octanoylated ghrelin, obestatin and GH secretions was evaluated by iterative blood sampling every 20 minutes during 6 hours in freely moving adult male rats. The half-life of exogenous obestatin (10 µg iv) in plasma was about 22 minutes. Plasma obestatin levels exhibited an ultradian pulsatility with a frequency slightly lower than octanoylated ghrelin and GH. Ghrelin and obestatin levels were not strictly correlated.

In conclusion these results show that obestatin, like ghrelin, is secreted in a pulsatile manner and that in some conditions; obestatin can modulate exogenous ghrelin action. It remains to be determined whether obestatin modulates endogenous ghrelin actions.

Introduction:

Ghrelin was identified in 1999 as the endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor 1a (GHSR 1a) (1). Soon after its discovery, in addition to its strong GH releasing activity (2, 3), ghrelin was found to increase food intake, downregulate energy expenditure and conserve body fat, causing weight gain and adipogenesis (4-7). However, if exogenous ghrelin actions are well established, the role of endogenous ghrelin is still unclear. Ghrelin antagonists have significant effects on these two functions (8-10) and active vaccination against ghrelin immunoconjugates decreases feed efficiency, relative adiposity and body weight gain in mature rats (11). Mice invalidated for the preproghrelin or ghrelin receptor gene do not display a major phenotype in term of body growth (12, 13) but are protected against early-onset obesity (14, 15). The recent identification of obestatin, a new peptide derived from preproghrelin which has been reported to bind to and activates the orphan receptor GPR39 (16, 17) may explain such discrepancies. Indeed, obestatin exhibits opposite effects of ghrelin on energy homeostasis and gastrointestinal function but appears ineffective on GH secretion (17).

In the present work we further investigated obestatin's ability to modulate spontaneous or ghrelin induced food intake and GH secretion. Plasma obestatin, ghrelin and GH levels were monitored by selective assays. Food intake was measured at the onset of the dark phase in fed-and in 24h-fasted/refed mice. GH secretion was evaluated *ex vivo* from superfused rat pituitaries and *in vivo* in freely moving male rats. Finally, the relationship between obestatin, (18-20) ghrelin and GH secretion was assessed by sampling blood every 20 min for 6 consecutive hours, the first three corresponding to the end of the light-on period and the last three to the beginning of the light-off period.

Materials and Methods

Animals:

Four weeks before experiments, adult male C57Bl/6 mice and Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Inc., L'Arbresle, France) weighing respectively between 20 and 25g and 100 and 125 g at the onset of the experiment were housed individually in transparent plastic containers placed in a sound proof room with controlled temperature (22–24 C) and illumination (12 h light, 12 h dark schedule with lights off at 1700 h). They had free access to food and water and they were regularly weighed and handled in order to minimize manipulation stress. Animal experiments were performed according to the guidelines of the French Act of Animal Care and Experimentation (1990; registration number 75–343). All

efforts were made to minimize pain and suffering and to reduce the number of animals used.

***In vivo* experiments**

Mouse experiments. For the food intake experiments, C57Bl/6 mice had free access to food and water until the fasting period. Every other day during the two weeks before the experiments, mice received intra-peritoneal saline injections in order to minimize stress. They were assigned randomly to the fast and fed groups. One day before the experiment a group was fasted for 24h. On the day of the experiment, animals received an intra-peritoneal (ip) injection of saline, ghrelin, obestatin or obestatin + ghrelin (1 μ mol/kg each; NeoMPS Strasbourg, France) one hour before the onset of the dark period. Fasted animals were given access to food just after the injection. In a first set of experiments, blood samples were withdrawn from the jugular vein at 1600h after anaesthesia with ketamine-xylazine in order to determine endogenous levels of ghrelin, obestatin, and glucose at injection time. In a second one, food intake was monitored 1, 3, 5 and 18h after the injection. Finally, in a third one, animals were decapitated one hour after peptide injection and blood was sampled in order to determine glucose levels (measured by glucose oxydase; Beckman analyzer II; Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Rat experiments. Two days before blood sampling, an indwelling cannula was inserted into the right atrium as previously described (21). Two hours before the sampling period, the distal extremity of the cannula was connected to a polyethylene catheter filled with 25 IU/ml heparinized saline. Blood samples were collected on EDTA (1mg/ml) and p-hydroxy-mercuribenzoic acid (PHMB, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) (0.36mg/ml) to avoid ghrelin degradation, immediately centrifuged and plasma was stored at -20°C until hormone assays. Blood from donor rats was regularly reinjected to attenuate hemodynamic modifications.

In experiment 2, saline, obestatin (10 μ g/rat), ghrelin (10 μ g/rat) or obestatin plus ghrelin were administered intravenously at 1000h and blood samples withdrawn just before and 5, 10, 20, 30, 45 and 60 min after injection for GH determination.

In experiment 3, the half life of obestatin in plasma was determined. Blood samples were collected 0, 5, 10, 20, 30, 45 and 60 minutes after IV injection of 10 μ g of obestatin and plasma obestatin levels were measured. Half life was calculated as $t_{1/2} = \ln(2)/K_{el}$ where K_{el} = -slope.

In experiment 4, blood was sampled every 20 min from 1400h to 2000h, in order to compare endogenous obestatin, octanoylated ghrelin and GH secretory parameters.

***Ex vivo* experiments**

Rats were sacrificed by decapitation. Pituitaries were rapidly dissected, washed for 30 min in oxygenated Dulbecco's modified Eagle's medium (with L-glutamine, 4.5 g glucose, L-1 and 25 mM HEPES) containing 0.1% bovine serum albumin, placed in perfusion chambers (vol 0.3 ml) and superfused at a rate of 0.1 ml/min with the same medium. After a 120-min equilibration period, effluents were collected every 5 min. Peptides were added to the medium during 15-min periods. Samples were frozen until GH determinations.

Hormone assays:

Octanoylated ghrelin was measured by an in-house immuno-enzymatic assay using polyclonal rabbit antibodies made against N-terminal rat ghrelin (kindly provided by Dr. Hosoda, Osaka, Japan), and human ghrelin coupled to acetylcholinesterase (Spibio, Saclay, France) as tracer. The sensitivity was 6 pmole/L and the intraassay coefficient of variation was 7 %.

Obestatin levels were determined with a commercial RIA kit (Phoenix, Belmont, CA). We have verified that rat pre-proghrelin 52-85 and 86-117 (Phoenix, Belmont, CA) do not cross-react up to the concentration of 3973 pmole/L. The sensitivity of this assay was 4 pmole/L and the intraassay coefficient of variation was 8 %.

Plasma GH concentrations were evaluated by EIA as previously described (22). Values are reported in terms of rGH-RP2, with sensitivity of 0.6 ng/ml and intra- and interassay coefficients of variation were 4 and 14 % respectively

Statistical analysis:

Acylated ghrelin, obestatin and GH pulse analysis was performed using the Cluster 8 software (23) with the *t* value set to 2 to maintain false positive rates under 1%. Number of point for a peak and number of point for a nadir were set to 1 and 2 respectively.

Approximative entropy was calculated using the MC-ApEn software using R-value set to 0.2 and number of MC cycle set to 1000.

These programs are available from: <http://mljohnson.pharm.virginia.edu/home.html>.

Values are given as means \pm sem, and statistical analysis was performed by ANOVA and paired *t* test using the JMP IN 5.1 software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Results:

24 hours of fasting significantly reduced glycaemia (131 ± 18 vs 313 ± 44 mg/dl in ad libitum fed mice; $P<0.01$) and obestatin levels (256 ± 6 vs 320 ± 12 pmole/L; $P<0.01$) while it increased octanoylated ghrelin (787 ± 225 vs 279 ± 105 pmole/L; $P= 0.087$) ($n=4$).

Obestatin effects on spontaneous and ghrelin induced food intake at the onset of the dark period, in fed and 24h fasted mice.

As shown on figure 1, during the light-off period, spontaneous cumulative food consumption (after 1,3, 5 and 18h) was lower in ad libitum fed than in fasted mice given access to food. Administration of obestatin ($1\ \mu\text{mol/kg}$ body weight ip) one hour before light-off was ineffective to modify food intake in fed (fig 1B, 1C) or fasted/refed (fig 1A, 1C) mice during the following 18 hours. In the same conditions ghrelin ($1\ \mu\text{mol/kg}$ body weight ip) significantly stimulated food intake in fed mice only and co-administration of obestatin inhibited this effect. In fasted/refed mice, cumulative food intake was similar to that of ghrelin- treated fed mice.

In fed and fasted animals, ghrelin increased plasma glucose levels, one hour after the injection (Fed: saline 177.0 ± 6.6 mg/dl, ghrelin: 221.4 ± 18.0 mg/dl; $P<0.05$ vs saline; Fasted: saline: 249.6 ± 26.7 mg/dl, ghrelin: 342.4 ± 24.8 mg/dl; $P<0.01$ vs saline). Obestatin did not affect basal (Fed: 204.6 ± 8.9 mg/dl; Fasted: 240.0 ± 26.0 mg/dl) or ghrelin-induced glucose levels (Fed: 222.2 ± 10.3 mg/dl; Fasted: 321.6 ± 27.5 mg/dl).

***Ex vivo* and *in vivo* effects of obestatin on spontaneous and ghrelin induced GH release**

As shown on figure 2A, ghrelin (10^{-7}M) rapidly stimulated GH release from superfused pituitaries *ex vivo*. Obestatin (10^{-7} and 10^{-6} M) did not affect spontaneous or ghrelin-induced GH release.

In vivo, intravenous administration of rat/mouse ghrelin ($10\ \mu\text{g/rat}$) increased plasma GH levels as early as 5 min after the injection. The effect was maximal at 10 min and returned to basal levels after 45 to 60 minutes. Under the same conditions, obestatin ($10\ \mu\text{g/rat}$) did not change basal GH levels but markedly inhibited ghrelin-induced GH secretion (Figure 2B).

Obestatin, ghrelin and GH levels in freely moving rats.

Determination of plasma obestatin concentrations from 5 to 60 min after synthetic obestatin administration ($10\ \mu\text{g}$, iv) in freely moving rats showed that the peptide half life in

plasma was 22 ± 2 minutes ($n=6$) (Figure 3). This permitted to use a 20 min sampling periodicity during 6 hours to compare obestatin and ghrelin secretory profiles.

Individual profiles of obestatin, ghrelin and GH secretion are displayed on figure 4. Plasma obestatin levels exhibited pulsatile variations of moderate amplitude, comparable with those of ghrelin.

Pulsatility parameters for obestatin, ghrelin and GH secretory profiles are indicated in table 1. Peak amplitudes are similar for ghrelin and obestatin (increase of 54% for obestatin and 81% for ghrelin) and of lesser amplitude than those of GH (increase of 370%). Obestatin pulse frequency is slightly lower than that of octanoylated ghrelin or GH. Regularity of secretion determined by approximative entropy (ApEn) is very similar for obestatin, ghrelin, and GH.

When all samples were pooled, obestatin and ghrelin levels were significantly but weakly correlated ($r^2=0.0297$, $P=0.0344$). When data from each rat were treated separately, significant correlations between ghrelin and obestatin were only observed in 3 out of 8 rats (individual $r^2=0.3147$; 0.3990 ; 0.3566 , with $P=0.0125$, 0.0049 , 0.0069 respectively; all others $r^2<0.05$; overall correlation for these 3 rats, $r^2=0.1272$, $P=0.007$).

Discussion:

In the present study we observe that, in some conditions, obestatin can inhibit ghrelin effects on food intake, depending on the feeding status, and on GH secretion. However, it is ineffective *per se* on these parameters.

Our results on food intake are slightly different from those originally reported by Zhang et al. who observed an inhibitory effect of obestatin on spontaneous food intake in refed mice (17). In their study, obestatin effects were only observed in refed animals, sacrificed 2 hours after light onset whether our data were obtained just after the onset of the light-off period when animals begin to eat spontaneously (24). More recently, the vast majority of studies (18, 20, 25-29) with one exception (30), reported no effect of obestatin *per se* or on ghrelin-induced food intake in rats and mice (fed or fasted/refed), whatever the route of administration and mode of obestatin dilution. Effects of orexigenic/anorexigenic peptides such as ghrelin and obestatin likely depends upon the relative concentrations of other orexigenic/anorexigenic factors at the time of injection. Indeed, we observed that, injected one hour before light off, ghrelin stimulates food intake in fed animals but is ineffective at the same dose in fasted ones given access to food. Similar results were reported when experiments were performed during the light-on period with a very low increase of food

intake in refed animals compared with that of ad libitum ones (30% vs 320%) (17, 31). Endogenous ghrelin concentrations are markedly increased during fasting (125% after 24h fasting) in mice (32) and to a lesser extent just before light off (20 to 30%) in rats (33) (and Zizzari et al, unpublished data). The fact that ghrelin is effective only in fed mice and that in refed mice cumulative food intake is of the same magnitude than in ghrelin treated fed ones suggests that, beyond a certain threshold, additional exogenous ghrelin cannot further increase an already elevated food consumption. Reciprocally, the inefficiency of obestatin to alter spontaneous food intake at the beginning of the light-off period is probably not due to plasma ghrelin level increases since obestatin is able to counteract the effect of very high doses of exogenous ghrelin (1 $\mu\text{mol/kg}$). Other orexigenic/anorexigenic factors exhibit circadian variations which could modify obestatin or ghrelin responses. Numerous studies show modifications of NPY, GAL, β -endorphin and POMC gene expression at the onset of the dark phase (34-36) and it will be of interest to test obestatin and ghrelin responses in presence of variable concentrations of these factors.

It is generally believed that ghrelin exerts its orexigenic effect mainly by activating GHSR1a on hypothalamic arcuate nucleus NPY/AgRP neurons (37-40) but the mechanisms by which obestatin could modulate food intake are not yet known. Obestatin exerts its anorectic effect after intracerebroventricular administration at a low dose (8nmol/kg) suggesting a central action (17). Obestatin was originally reported to bind to GPR39, an orphan receptor, which shares similarities with GHSR1a (16, 17). GPR39 mRNA has been detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction in the hypothalamus and ^{125}I obestatin binding sites were reported in the same region (16, 17). Nevertheless, recent studies failed to confirm the presence of specific radio-labelled obestatin binding on GPR39 or activation of this receptor by obestatin (18-20). In preliminary experiments, we also observed that obestatin did not modify several signal transduction pathways in GPR-39 transfected cells (Pantel, et al unpublished data). It remains to determine which is the receptor for obestatin and how obestatin interferes with GHSR 1a to inhibit ghrelin stimulated food consumption. Since obestatin inhibits jejunal contractile activity and suppress gastric emptying activity (17), it cannot be excluded that its anorectic effect relies mostly on peripheral sites of action. The inhibition of jejunal contraction could generate an afferent vagus signal to induce satiety in the CNS.

As already reported (17, 27), we did not observe any effect of obestatin on spontaneous or ghrelin-induced GH release *ex vivo*. In contrast, when administered iv to rats,

obestatin significantly inhibited ghrelin stimulation of GH secretion. Ghrelin increases plasma GH levels by acting directly on pituitary but also indirectly at the hypothalamic level where it stimulates GHRH secretion (41) and decreases somatostatin release (3). Alternately, gastric vagal afferents are also an important pathway conveying ghrelin signals for GH secretion to the brain (42).

The present study shows, for the first time, that obestatin secretion is pulsatile and displays an ultradian rhythmicity, very similar to ghrelin and GH secretion. Interestingly however, plasma ghrelin and obestatin levels are not strictly correlated and the number of obestatin pulsatile episodes may seem slightly lower than the one observed for ghrelin and GH secretion. As obestatin and ghrelin are derived from the same gene, this lack of strict correlation supports the notion that obestatin is a physiologically relevant peptide and not only a non-functional connective peptide. Such an hypothesis is further substantiated by the differential effect of fasting on ghrelin and obestatin levels, ghrelin being markedly increased and obestatin slightly decreased after 24 hours of fasting. This strongly suggests that the secretion of the two peptides is regulated by the nutritional status in an opposite manner. It was previously shown that proopiomelanocortin, another multipeptide precursor, is cleaved into several bioactive fragments that include the anorectic α and β melanocyte-stimulating hormones and the orexigenic β -endorphin and that tissue-specific enzymes determine which of those peptides are generated (43). It remains to be determined whether a differential tissue specific post-translational process exists in the case of proghrelin and obestatin processing.

Acknowledgments:

We thank A. Cougnon for technical assistance. We are grateful to the NIDDK for providing with GH assay reagents.

References:

1. **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
2. **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
3. **Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, Rio MC, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT** 2001 In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 73:54-61
4. **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
5. **Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT** 2002 Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 143:1353-1361
6. **Tschop M, Smiley DL, Heiman ML** 2000 Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-913
7. **Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR** 2000 The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141:4325-4328
8. **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
9. **Kobelt P, Helmling S, Stengel A, Wlotzka B, Andresen V, Klapp BF, Wiedenmann B, Klussmann S, Monnikes H** 2006 Anti-ghrelin Spiegelmer NOX-B11 inhibits neurostimulatory and orexigenic effects of peripheral ghrelin in rats. *Gut* 55:788-792
10. **Zizzari P, Halem H, Taylor J, Dong JZ, Datta R, Culler MD, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT** 2005 Endogenous ghrelin regulates episodic growth hormone (GH) secretion by amplifying GH Pulse amplitude: evidence from antagonism of the GH secretagogue-R1a receptor. *Endocrinology* 146:3836-3842
11. **Zorrilla EP, Iwasaki S, Moss JA, Chang J, Otsuji J, Inoue K, Meijler MM, Janda KD** 2006 From the Cover: Vaccination against weight gain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13226-13231
12. **Sun Y, Ahmed S, Smith RG** 2003 Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol* 23:7973-7981
13. **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 U S A* 101:8227-8232
14. **Wortley KE, del Rincon JP, 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
15. **Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus JN, Lee CE, Jones JE, Deysher AE, Waxman AR, White RD, Williams TD, Lachey JL, Seeley RJ, Lowell BB, Elmquist JK** 2005 Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115:3564-3572

16. **McKee KK, Tan CP, Palyha OC, Liu J, Feighner SD, Hreniuk DL, Smith RG, Howard AD, Van der Ploeg LH** 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
17. **Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJ** 2005 Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310:996-999
18. **Holst B, Egerod KL, Schild E, Vickers SP, Cheetham S, Gerlach LO, Storjohann L, Stidsen CE, Jones R, Beck-Sickinger AG, Schwartz TW** 2006 GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology*
19. **Lauwers E, Landuyt B, Arckens L, Schoofs L, Luyten W** 2006 Obestatin does not activate orphan G protein-coupled receptor GPR39. *Biochem Biophys Res Commun* 351:21-25
20. **Tremblay F, Perreault M, Klamann LD, Tobin JF, Smith E, Gimeno RE** 2006 Normal food intake and body weight in mice lacking the G protein-coupled receptor GPR39. *Endocrinology*
21. **Bluet-Pajot MT, Durand D, Drouva SV, Mounier F, Pressac M, Kordon C** 1986 Further evidence that thyrotropin-releasing hormone participate in the regulation of growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 44:70-75
22. **Ezan E, Laplante E, Bluet-Pajot MT, Mounier F, Mamas S, Grouselle D, Grognet JM, Kordon C** 1997 An enzyme immunoassay for rat growth hormone: validation and application to the determination of plasma levels and in vitro release. *J Immunoassay* 18:335-356
23. **Veldhuis JD, Johnson ML** 1986 Cluster analysis: a simple, versatile, and robust algorithm for endocrine pulse detection. *Am J Physiol* 250:E486-493
24. **Armstrong S** 1980 A chronometric approach to the study of feeding behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 4:27-53
25. **Gourcerol G, Million M, Adelson DW, Wang Y, Wang L, Rivier J, St-Pierre DH, Tache Y** 2006 Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signaling in rodents. *Peptides* 27:2811-2819
26. **Nogueiras R, Pfluger P, Tovar S, Myrtha A, Mitchell S, Morris A, Perez-Tilve D, Vazquez MJ, Wiedmer P, Castaneda TR, Dimarchi R, Tschop M, Schurmann A, Joost HG, Williams LM, Langhans W, Dieguez C** 2006 Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology*
27. **Samson WK, White MM, Price C, Ferguson AV** 2006 Obestatin acts in brain to inhibit thirst. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*
28. **Seoane LM, Al-Massadi O, Pazos Y, Pagotto U, Casanueva FF** 2006 Central obestatin administration does not modify either spontaneous or ghrelin-induced food intake in rats. *J Endocrinol Invest* 29:RC13-15
29. **Yamamoto D, Ikeshita N, Daito R, Herningtyas EH, Toda K, Takahashi K, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K, Okimura Y** 2006 Neither intravenous nor intracerebroventricular administration of obestatin affects the secretion of GH, PRL, TSH and ACTH in rats. *Regul Pept*
30. **Bresciani E, Rapetti D, Dona F, Bulgarelli I, Tamiazzo L, Locatelli V, Torsello A** 2006 Obestatin inhibits feeding but does not modulate GH and corticosterone secretion in the rat. *J Endocrinol Invest* 29:RC16-18
31. **Neary NM, Druce MR, Small CJ, Bloom SR** 2006 Acylated ghrelin stimulates food intake in the fed and fasted states but desacylated ghrelin has no effect. *Gut* 55:135

32. **Nonogaki K, Ohashi-Nozue K, Oka Y** 2006 A negative feedback system between brain serotonin systems and plasma active ghrelin levels in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 341:703-707
33. **Drazen DL, Vahl TP, D'Alessio DA, Seeley RJ, Woods SC** 2006 Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology* 147:23-30
34. **Akabayashi A, Koenig JI, Watanabe Y, Alexander JT, Leibowitz SF** 1994 Galanin-containing neurons in the paraventricular nucleus: a neurochemical marker for fat ingestion and body weight gain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10375-10379
35. **Steiner RA, Kabigting E, Lent K, Clifton DK** 1994 Diurnal rhythm in proopiomelanocortin mRNA in the arcuate nucleus of the male rat. *J Neuroendocrinol* 6:603-608
36. **Xu B, Kalra PS, Farmerie WG, Kalra SP** 1999 Daily changes in hypothalamic gene expression of neuropeptide Y, galanin, proopiomelanocortin, and adipocyte leptin gene expression and secretion: effects of food restriction. *Endocrinology* 140:2868-2875
37. **Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop 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
38. **Seoane LM, Lopez M, Tovar S, Casanueva FF, Senaris R, Dieguez C** 2003 Agouti-related peptide, neuropeptide Y, and somatostatin-producing neurons are targets for ghrelin actions in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 144:544-551
39. **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
40. **Willesen MG, Kristensen P, Romer J** 1999 Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70:306-316
41. **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
42. **Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M** 2002 The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123:1120-1128
43. **Castro MG, Morrison E** 1997 Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain. *Crit Rev Neurobiol* 11:35-57

Figure Legends:

Table 1: Analysis of octanoylated ghrelin, obestatin and GH pulsatility parameters.

Data are mean \pm sem of 8 rats.

Figure 1: Obestatin effects on spontaneous and ghrelin-induced food intake, in fed and 24h fasted mice, during the dark period.

Cumulative food intake 1, 3, 5 hours after injection of saline (blue square), 1 μ mol/kg ghrelin (green square), 1 μ mol/kg obestatin (dark triangle) or 1 μ mol/kg obestatin + ghrelin (red triangle) : Panel A : in 24 h refeeding fasted mice (n= 20, 5 in each group) ; Panel B : in ad libitum fed mice (n= 20, 5 in each group)

a: ghrelin vs saline, P<0.01 ; b : ghrelin vs obestatin, P<0.01 ; c : ghrelin vs obestatin + ghrelin, P<0.05 ; d : ghrelin vs obestatin, P<0.05

Panel C : Cumulative food intake 18 h post injection in 24 h fasted (left) and ad libitum fed (right) mice receiving saline (blue), 1 μ mol/kg ghrelin (green), 1 μ mol/kg obestatin (dark) or 1 μ mol/kg obestatin + ghrelin (red)

a : ghrelin vs saline, P<0.05 ; b : ghrelin vs obestatin, P=0.06

Figure 2: Obestatin effects on spontaneous or ghrelin induced GH secretion in the rat

Panel A : Mean profile of GH release from superfused rat pituitaries in basal condition and after infusion of obestatin 10⁻⁶M (dark triangle), ghrelin 10⁻⁷M (green square), obestatin 10⁻⁷M + ghrelin 10⁻⁷M (pink triangle), obestatin 10⁻⁶M + ghrelin 10⁻⁷M (red triangle). The different peptides were infused during 15 minutes (materialised by dotted line). Each point and vertical bar indicates mean \pm sem of 4 chambers.

Panel B : Effect of 10 μ g obestatin (dark triangle), 10 μ g ghrelin (green square) or 10 μ g obestatin + ghrelin (red triangle) on GH secretion in freely moving rats. The peptides were injected at t=0, and blood were collected pre-injection and 5, 10, 20, 30, 45, 60 minutes post injection. Data are means \pm sem. Number of animals are indicated in parentheses.

*: Ghrelin vs Obestatin + Ghrelin, P<0.05; #: Ghrelin vs Obestatin, P<0.05

Figure 3: Determination of exogenous obestatin half-life in rat plasma.

Obestatin immunoreactivity was detected by RIA in rat plasma after iv injection of 10 μ g synthetic peptide. Data are expressed as % obestatin concentrations measured immediately

after the injection. Values are the means \pm sem of six determinations. A semilogarithmic plot of the data is given in the inset.

Figure 4 : Ghrelin, obestatin and GH profiles in freely moving rats

Representative octanoylated ghrelin (triangle), obestatin (red square) and GH (diamond-shaped) secretory patterns during a 6-h sampling period (3-h during the light period and 3-h during the dark period) in four freely moving male rats.

Table1

	Mean levels (pmole/l)	Nadir (pmole/l)	Peak amplitude (pmole/l)	Peak frequency /360 min	Peak interval (min)	ApEn (1,20)
Ghrelin	358±25	259±21	452±21	2.25±0.25	85±14	0.739±0.051
Obestatin	317± 8	253±12	385±17	1.50±0.27 ^{a, b}	117±52	0.758±0.029
	(ng/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)		(min)	
GH	19±3	12±4	40±7	2.28±0.36	89±16	0.810±0.060

Data are mean±sem of eight rats

^a, P=0.073 vs ghrelin; ^b, P=0.077 vs obestatin

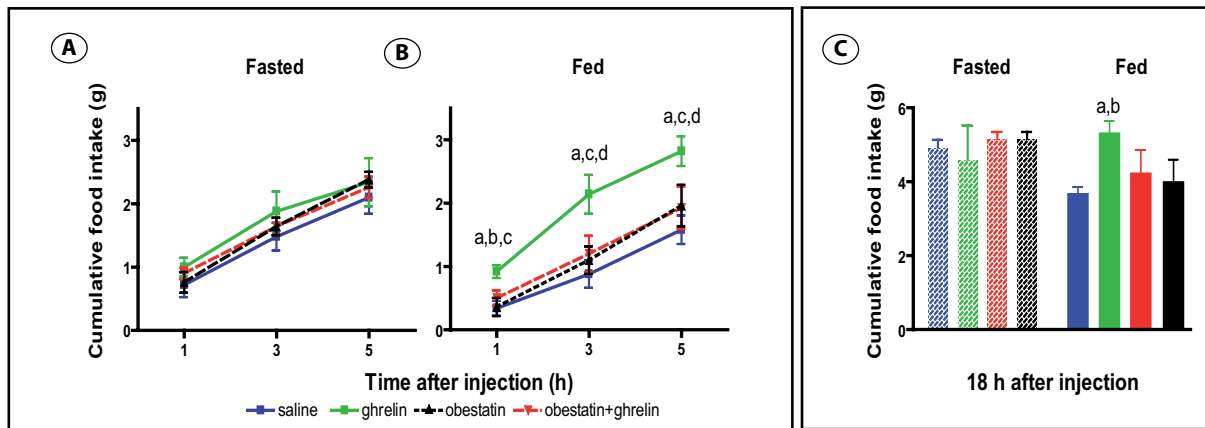


Figure 1

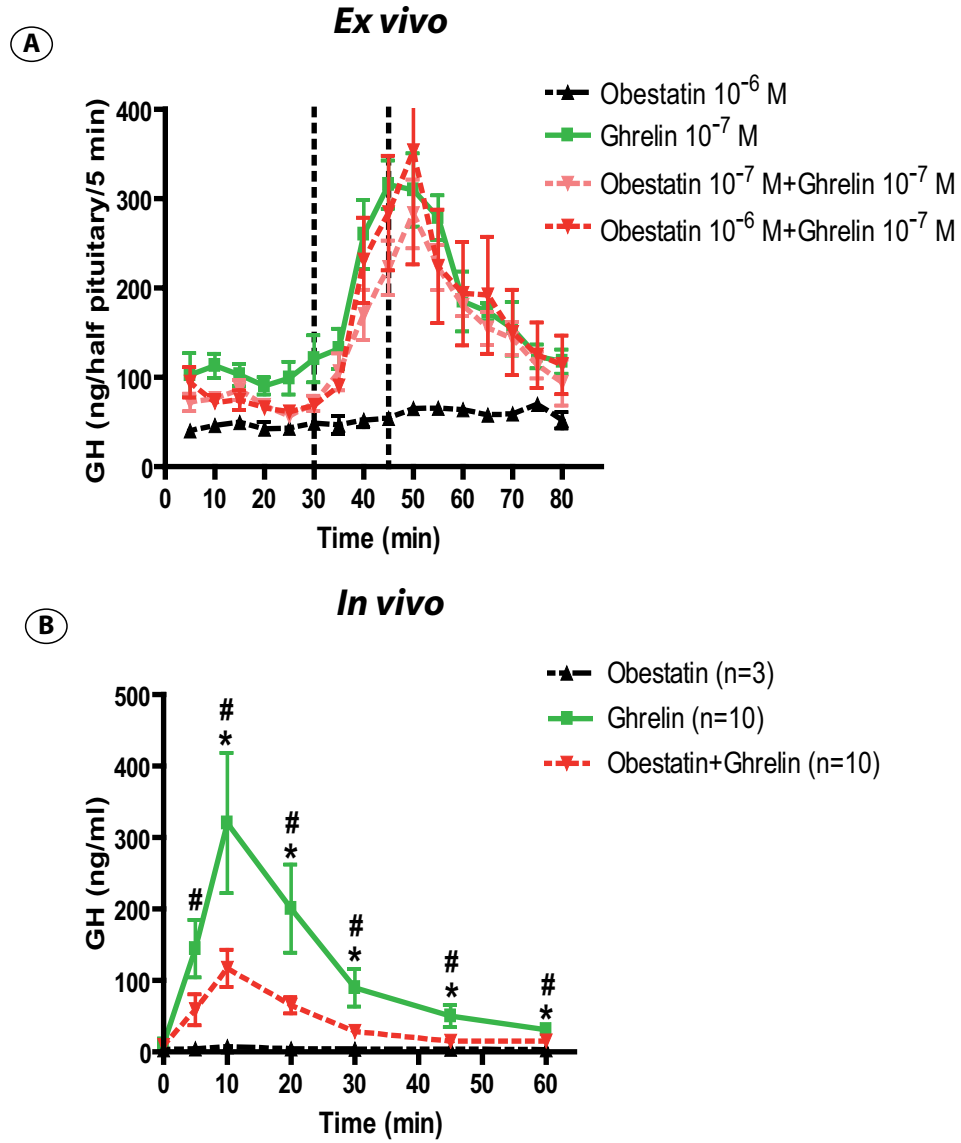


Figure 2

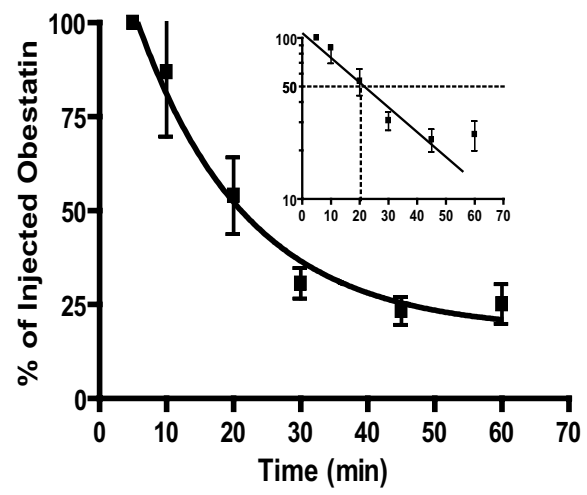


Figure 3

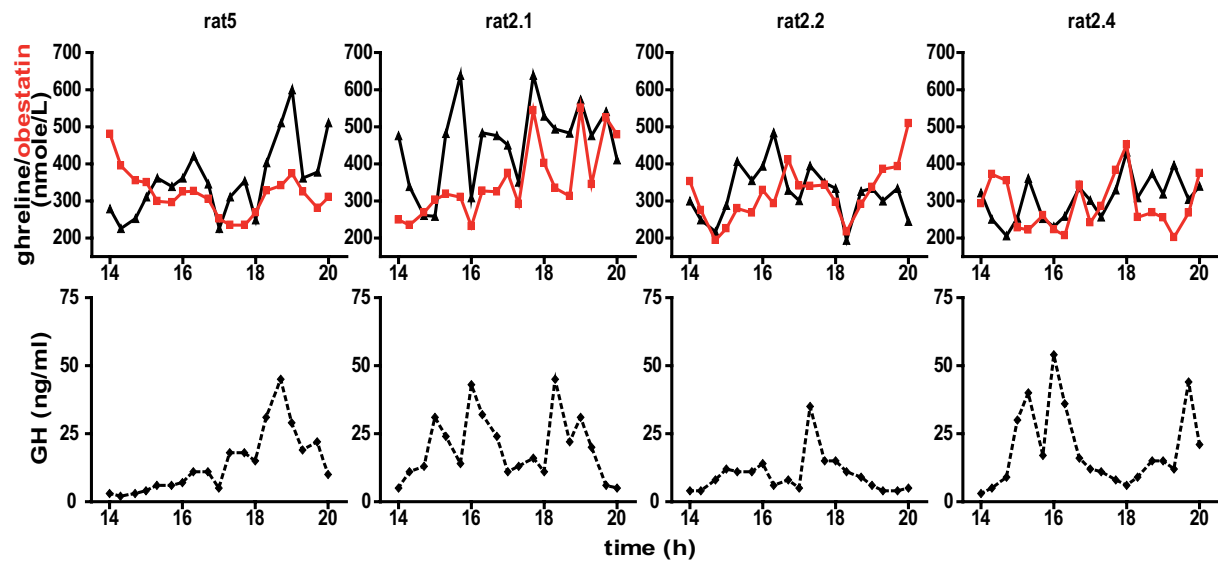


Figure 4

Récemment une nouvelle hormone anorexigène, l'obestatine, a été identifiée chez le rat par des chercheurs de l'Université de Stanford (Zhang *et al.*, 2005). En comparant les séquences de preproghrelina chez onze espèces de mammifères ils ont remarqué que, outre la ghrelina mature qui suit immédiatement le peptide signal, une autre région encadrée par des sites de clivage potentiels était très bien conservée. Ceci les a conduits à faire l'hypothèse de l'existence d'un second peptide, long de 23 acides aminés possédant une glycine en C terminal et donc pouvant être amidé. Chez la souris, une version synthétique de ce peptide, diminue la quantité de nourriture ingérée, spontanément ou après injection de ghrelina, lors de la renutrition après 16 heures de privation. De plus elle diminue la prise de poids lors de traitement chronique chez le rat. L'obestatine se lierait au récepteur orphelin GPR39, récepteur qui partage des séquences avec le GHS-R1a de la ghrelina.

Avec la découverte de ce nouveau peptide un certain nombre de questions se pose, notamment peut il rendre compte de l'absence de phénotype des souris KO ghrelina ? Peut il aussi nous aider à mieux comprendre pourquoi le rôle de la ghrelina endogène est si difficile à mettre en évidence ?

Ceci nous a amené à caractériser la sécrétion d'obestatine : était-elle en relation

- avec celle de ghrelina ? elles peuvent être co-libérées, leur libération peut être régulée de manière opposée.....
- avec la sécrétion de GH ? Seul un effet direct hypophysaire sur la sécrétion de GH *in vitro* avait été recherché. Même s'il n'existe pas, un effet indirect par exemple hypothalamique, ne pouvait être exclu étant donné que Zhang et coll. décrivaient la présence de récepteurs GPR39 dans différentes régions dont l'hypothalamus.
- avec l'état nutritionnel ? De façon surprenante les auteurs de cet article n'observaient aucune modification des taux circulants d'obestatine en fonction de l'état nutritionnel de leurs animaux

Au préalable nous avons cherché à compléter les données existantes en évaluant l'effet d'une injection aigue d'obestatine, d'une part sur la prise alimentaire dans différentes conditions nutritionnelles et d'autre part sur la libération de GH.

Les résultats sont présentés et discutés dans l'article 5 et sur la figure 8R

En résumé dans nos conditions expérimentales l'obestatine n'a pas d'effet par elle-même ni sur la prise alimentaire, ni sur la sécrétion de GH mais elle est capable d'inhiber

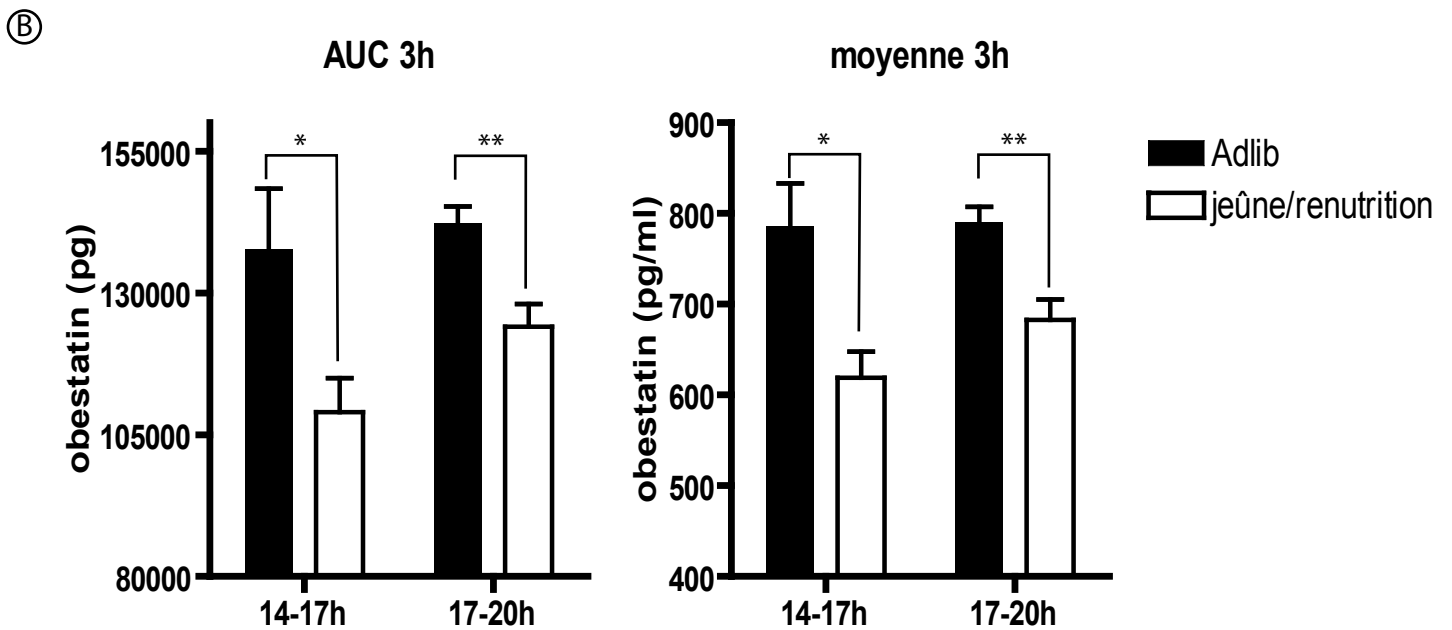
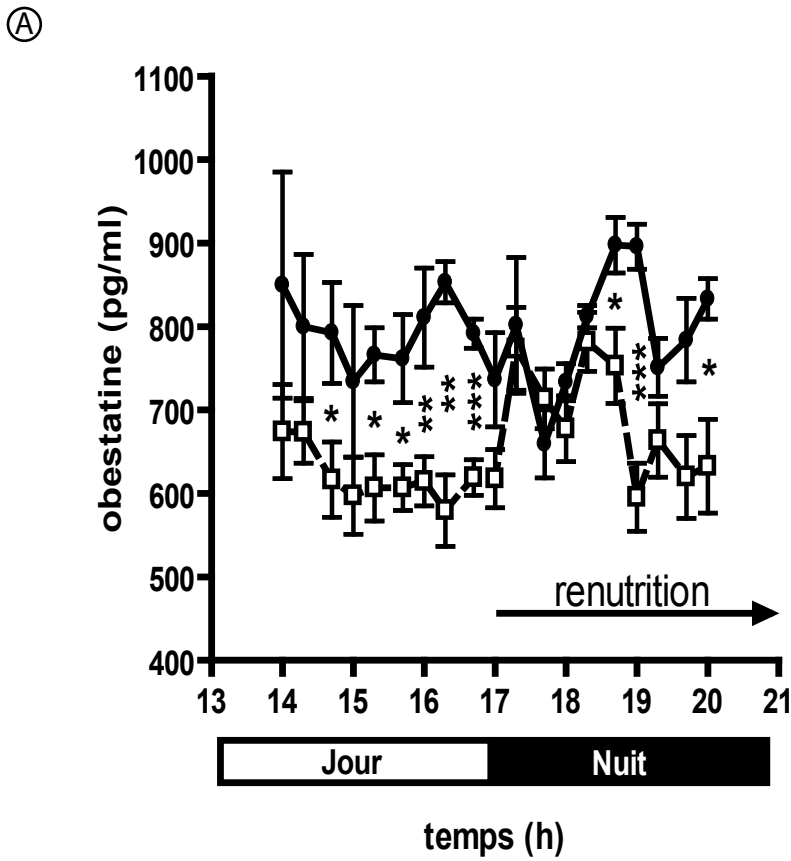


Figure 8R :Variation des taux d'obestatine en fonction du statut nutritionnel.

A- Profils moyens d'obestatine chez des animaux nourris ad libitum et chez des animaux à jeûn depuis 72h. Les animaux sont prélevés toutes les 20 minutes, 3 heures avant et 3 heures après l'extinction des lumières. Les animaux jeuneurs ont de nouveau accès à la nourriture à l'extinction des lumières à 17h.

B- Aire sous la courbe (AUC) d'obestatine et moyenne quantifiées avant et après l'extinction des lumières.

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

totalement l'effet orexigène de la ghreline chez des animaux nourris ad libitum et partiellement l'effet central de la ghreline sur la sécrétion de GH.

L'obestatine endogène est libérée de façon rythmique tout comme la ghreline mais avec une fréquence d'apparition des pics légèrement plus faible. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation stricte entre taux d'obestatine et taux de ghreline (cette corrélation n'existe que chez 3 rats sur 8), ni entre taux d'obestatine et taux de GH.

Les taux d'obestatine varie avec l'état nutritionnel. Chez la souris après 24 h de jeûne les taux d'obestatine sont diminués alors que ceux de ghreline sont augmentés (cf article). Des résultats comparables sont obtenus dans une expérience préliminaire chez le rat. Dans ce cas des rats mâles Sprague Dawley de 300-350g habitués pendant 3 semaines à un environnement 12h jour/12h nuit avec extinction des lumières à 17h ont été mis ou non à jeûner pendant 72h puis prélevés toutes les 20 min de 14h à 20h soit 3h avant et 3h après l'extinction des lumières, les animaux jeûneurs étant re-nourris à 17h. Comme le montre la figure 8R dans ces conditions les taux d'obestatine sont inférieurs chez les animaux à jeun et un pic transitoire de l'hormone est observé lors de la renutrition.

Ces résultats préliminaires posent un certain nombre de questions et notamment

- Comment sont régulées les libérations de ghreline et obestatine, toutes deux issues du même précurseur. Nous avons vu que ces 2 sécrétions étaient régulées de manière opposée par l'état nutritionnel. Existe-t-il, comme dans le cas de la POMC, des enzymes spécifiques qui vont déterminer laquelle va être générée dans une situation donnée ? Récemment, la prohormone convertase 1/3 a été montrée indispensable à la conversion de la proghreline en ghreline (Zhu *et al.*, 2006). Est elle impliquée dans la production d'obestatine ? ou est ce d'autres prohormones convertases ?
- Quel récepteur est activé par l'obestatine ? Le GPR39 semble de moins en moins être le bon candidat. De nombreux auteurs ne le détectent pas dans l'hypothalamus soit par hybridation in situ (Jackson *et al.*, 2006) soit par PCR quantitative (Holst *et al.*, 2006; Nogueiras *et al.*, 2006). De plus l'obestatine ne semble pas se fixer sur des cellules transfectées avec ce récepteur (Holst *et al.*, 2006), ni les activer (Holst *et al.*, 2006; Lauwers *et al.*, 2006); la présence de Zn²⁺ pourrait être responsable de l'activation observée par Zhang et al (Lauwers *et al.*, 2006).

4^{ème} partie :

Polymorphismes dans le gène ghrelina /obestatine et troubles du comportement alimentaire

Article 6 : Dardennes RM*, Zizzari P*, Tolle V, Foulon C, Kipman A, Romo L, Iancu-Gontard D, Boni C, Sinet PM, Bluet Pajot MT, Estour B, Mouren MC, Guelfi JD, Rouillon F, Gorwood P, Epelbaum J: Family trios analysis of common polymorphisms in the obestatin/ghrelin, BDNF and AGRP genes in patients with Anorexia nervosa : association with subtype, body-mass index, severity and age of onset. A paraître dans Psychoneuroendocrinology.

* co-premiers auteurs

Article 6 : Dardennes RM*, Zizzari P*, Tolle V, Foulon C, Kipman A, Romo L, Iancu-Gontard D, Boni C, Sinet PM, Bluet Pajot MT, Estour B, Mouren MC, Guelfi JD, Rouillon F, Gorwood P, Epelbaum J: Family trios analysis of common polymorphisms in the obestatin/ghrelin, BDNF and AGRP genes in patients with Anorexia nervosa : association with subtype, body-mass index, severity and age of onset. A paraître dans Psychoneuroendocrinology.

* co-premiers auteurs

Available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/psyneuen

Family trios analysis of common polymorphisms in the obestatin/ghrelin, BDNF and AGRP genes in patients with Anorexia nervosa: Association with subtype, body-mass index, severity and age of onset

Roland M. Dardennes^{a,b,1}, Philippe Zizzari^{b,1}, Virginie Tolle^b, Christine Foulon^c, Amélie Kipman^d, Lucia Romo^e, Dana Iancu-Gontard^b, Claudette Bonif^f, Pierre-Marie Sinet^b, Marie Thérèse Bluet^b, Bruno Estour^g, Marie-Christine Mouren^{d,h}, Julien-Daniel Guelfi^a, Frédéric Rouillon^a, Philip Gorwood^{e,h}, Jacques Epelbaum^{b,*}

^aUniversité Paris-Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Sainte-Anne, 1 rue Cabanis, 75674 Paris Cedex 14, France

^bINSERM, UMR 549, Centre Paul Broca, 2 ter rue d'Alésia, 75014 Paris, France

^cHôpital Sainte-Anne, 1 rue Cabanis, 75674 Paris Cedex 14, France

^dUniversité Paris 7, Faculté de Médecine, Hôpital Robert Debré, 48 boulevard Sérurier, 75935 Paris cedex 19, France

^eUniversité Paris 7, Faculté de Médecine, Hôpital Louis Mourier 178, rue des Renouillers, 92701 COLOMBES CEDEX, France

^fINSERM, U288, Faculté Pitié-Salpêtrière-91 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France

^gUniversité Jean Monnet, Hôpital Bellevue, 42055 Saint-Etienne Cedex 2, France

^hINSERM, U675, Faculté Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard 75018 Paris, France

Received 20 September 2006; received in revised form 9 November 2006; accepted 12 November 2006

KEYWORDS

Anorexia nervosa;
Ghrelin;
Agrp;
Bdnf;
Trios analysis;
Genes

Summary

Anorexia nervosa (AN) affects 0.3% of young girls with a mortality of 6%/decade and is strongly familial with genetic factors. Ghrelin is an upstream regulator of the orexigenic peptides NPY and AgRP and acts as a natural antagonist to leptin's effects on NPY/AgRP-expressing neurons, resulting in an increase in feeding and body weight. Obestatin which counteracts ghrelin action on feeding is derived from the same propeptide than ghrelin. BDNF has been involved in body weight regulation and its Val66Met polymorphism associated with AN. We therefore re-investigated the association between AN and the Leu72Met and Gln90Leu polymorphisms of the prepro-ghrelin/obestatin gene, the Ala67Thr polymorphism of AgRP and the Val66Met polymorphism of BDNF taking into account clinical subtypes (restrictive—ANR—and bingeing/purging—ANB—subtypes).

*Corresponding author. Tel.: +33 1 40 78 92 82; fax: +33 1 45 80 72 93.

E-mail address: epelbaum@broca.inserm.fr (J. Epelbaum).

¹Each of these authors contributed equally to this work.

0306-4530/\$ - see front matter © 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.psyneuen.2006.11.003

Please cite this article as: Dardennes, R.M., et al., Family trios analysis of common polymorphisms in the obestatin/ghrelin, BDNF and AGRP genes in.... Psychoneuroendocrinology (2007), doi:10.1016/j.psyneuen.2006.11.003

Family trios study of these 4 single nucleotide polymorphisms were performed in 114 probands with AN and both their parents recruited in two specialized French centres. A transmission disequilibrium was observed for the Leu72Met SNP of the preproghrelin gene and for the Ala67Thr SNP of the AgRP gene. When stratified by clinical subtype, these two polymorphisms were preferentially transmitted for the trios with a bingeing/purging proband. An excess of transmission of the Gln90Leu72 preproghrelin/obestatin haplotype in patients with AN was observed. These results do not provide evidence for a preferential transmission of the 66Met allele of BDNF but support the hypothesis that ghrelin and AGRP polymorphisms confers susceptibility to AN. Further simultaneous analysis of genetic variants of the biological determinants of energy metabolism and feeding behaviour in very large populations should contribute to the understanding of the high degree of heritability of eating disorders and to the description of pathophysiological patterns leading to life-threatening conditions in a highly redundant system.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Anorexia nervosa (AN) is a chronic disease characterized by progressive cachexia in individuals, mainly women, continuously obsessed with weight gain and engaging in behaviours designed to perpetuate weight loss in spite of their obvious emaciation. The prevalence has been reported to be 0.3% for young females with a peak age of onset between 15 and 19 yr old (Hoek and van Hoeken, 2003). Mortality is estimated to be 6%/decade (Sullivan, 1995). The course of AN is often marked by crossover to bulimia nervosa, mainly occurring within the first 5 yr (Tozzi et al., 2005). Family and twin studies have consistently demonstrated that AN is strongly familial and that the observed familiarity is due primarily to genetic factors (Gorwood et al., 2003). These findings led to a great increase in molecular genetic studies (Klump and Gobrogge, 2005). Most studies focused on the serotonin system, but other candidate genes have been studied, including genes involved in the regulation of feeding and energy (e.g., neuropeptide Y, leptin, agouti-related protein (AgRP) and brain derived neurotrophic factor (BDNF), (cf. Klump and Gobrogge (2005)). The role of these genes in the etiology of AN is still hypothetical as these studies have rarely been replicated.

Another candidate gene is the gene encoding for ghrelin, a strong orexigenic and adipogenic peptide in mammals (Nakazato et al., 2001). Inhibiting ghrelin-receptor expression in the hypothalamus of transgenic rats by expressing anti-sense ghrelin receptor mRNA decreases food intake, and body fat mass (Shuto et al., 2002), suggesting the importance of the hypothalamic ghrelin receptors in energy homeostasis. Ghrelin is an upstream regulator of the orexigenic peptides NPY and AgRP and acts as a natural antagonist to leptin's effects on NPY/AgRP-expressing neurons, resulting in an increase in feeding and body weight (Zigman and Elmquist, 2003). Human ghrelin is a 28-amino acid peptide, its gene is located on chromosome 3p25-26 and consists of 4 exons and 3 introns (Wajrnajch et al., 2003). IV administration of ghrelin to healthy humans increases subjective appetite and energy intake from a buffet lunch by 28% (Wren et al., 2001). Plasma ghrelin levels are highly elevated in patients with AN and return to normal after weight gain (Otto et al., 2001; Tolle et al.,

2003). It has been shown that the binge-eating/purging subtype group had higher levels than the restricting subtype and still had higher levels than the controls after weight gain (Tanaka et al., 2004). Moreover, carriers of the Met72 allele of the preproghrelin/ghrelin gene may be protected against fat accumulation and associated metabolic comorbidities in the general population and in obese populations as well (Ukkola et al., 2002). Obestatin, a recently discovered peptide derived from the same prepropeptide (Zhang et al., 2005), may explain the lack of obvious phenotype in adult ghrelin *-/-* mice as obestatin exerts ghrelin-opposite anorexigenic effects by decreasing food intake, gastric emptying, jejunal motility, and weight gain. The Gln90Leu polymorphism of the preproghrelin gene is caused by a SNP which lies in the region coding for obestatin. A recent study, performed on 529 trios recruited from 7 European countries indicated different genotype and allele frequency distribution in this polymorphism according to the country (Cellini et al., 2006). We therefore re-investigated the association between AN and the Leu72Met and Gln90Leu polymorphisms of the prepro-ghrelin gene (Met72GHREL and Leu90OBE), taking into account clinical subtypes (restrictive—ANR—and Bingeing/purging—ANB—subtypes). Moreover, since ghrelin regulates AgRP orexigenic neurons and the Ala67Thr polymorphism of AgRP (Thr67AGRP) has been associated with AN (Vink et al., 2001), and also since BDNF has been involved in body weight regulation and its Val66Met polymorphism (Met66BDNF) associated with AN (Ribases et al., 2003, 2004, 2005a, b; Hashimoto et al., 2005), these polymorphisms were analysed.

2. Methods

2.1. Subjects

114 probands with AN and both their parents were recruited in two French Centres specialized in eating disorders (Centre Hospitalier Saint Anne (49 trios) and Hôpital Robert Debré (65 trios)). All patients fulfilled DSM-IV (American Psychiatric Association and American Psychiatric Association Task Force on DSM-IV, 1994) criteria for AN, the diagnosis being based on the Diagnostic Interview for Genetic Studies (Nurnberger et al., 1994). All probands were classified as

restricting or binge-eating/purging subtype. Diagnosis was blind to genotype. Clinical information included age of onset (defined as the year the weight loss started), lifetime minimal Body Mass Index (BMI), scores of the Eating Attitude-Test (Garner et al., 1982) (EAT-26), Eating Disorder Inventory (Garner et al., 1983) (EDI), and Beck Depression Inventory (Beck and Beamesderfer, 1974) (BDI), and age of first menses. Both parents accepted to participate in the study. Written informed consent was obtained from both parents and patients (probands). The study protocol was approved by the appropriate ethics committee (CCPPRB Bichat).

2.2. Genotype detection

Germline DNA was extracted from peripheral blood collected after the interview. DNA was isolated from leucocytes using standard salting out procedures (Miller et al., 1988).

AgRP Ala67Thr (G/A), BDNF Val66Met (G/A)—SNP ID : rs6265 -, prepro-Ghrelin Leu72Met (C/A)—SNP ID : rs696217—and prepro-Ghrelin Gln90Leu (A/T)—SNP ID : rs4684677—polymorphisms were assessed using the ABI Prism 7000 Sequence Detection System (SDS) for multicolour real-time polymerase chain reaction (PCR) detection (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

The primers and probe used for AgRP were design using Primer Express[®] software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and synthesized by Applied Biosystems using the context sequence: ACCCTTGCTCACACTGACCTGGAG[C/T]TCTGGGAGCAGGCCTGGTCAGGCC.

The other SNPs detection were performed using TaqMan[®] SNP Genotyping Assays.

For BDNF: (forward primer): 5'-GCTTGACATCATTGGCTGACA-3', (reverse primer): 5'-GGTCCATCCAACAGCTCTT-3' and (probe): 5'-[FAM]CTTTCGAACACGTGATAG-3' and 5' [VIC] CTTTCGAACACATGATAG-3' (Applied Biosystems Assay ID: C-11592758-10).

For prepro-Ghrelin

Leu72Met : (forward primer): 5'-CGCTGCCACAGAAGCA-TAAAA, (reverse primer): 5'-CCCGGAAGATGGAGGTCAA-3' and (probe): 5'-[FAM]CCGGACTTCCAGTTC-3' and 5' [VIC] CCCGGACTTCCATTT-3' (Applied Biosystems Assay ID : C_3151003_20).

Gln90Leu : context sequence : CAGGCCTGGCTGTGCTGCTGGTAC[A/T]GAACCCCTGACAGCTTGATTCCAAC (Applied Biosystems Assay ID: C-25607748-10).

The thermal cycling conditions used were 2 min hold at 50 °C followed by a 10 min hold at 95 °C and then 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min.

Repeatability of ABI Prism 7000 SDS genotyping was assessed by random reanalysis of a subsample of DNA samples. Depending on the cohort and on the gene PCR success rates were: Sainte-Anne, AgRP: 97.3%, BDNF: 99.1%, prepro-Ghrelin Leu72Met: 97.3%, prepro-Ghrelin Gln90Leu: 100%; Robert Debré, AgRP: 97.5%, BDNF: 99.1%, prepro-Ghrelin Leu72Met: 98.3% prepro-Ghrelin Gln90Leu: 99%.

2.3. Statistical analysis

Polymorphisms were analysed using the transmission disequilibrium test (TDT, McNemar χ^2 test (Spielman et al., 1993)). TDT analyses were performed for each polymorphism independently. *p* value assesses the significance of transmission distortion for specific haplotypes. Data were stratified by anorexia subtype (AN-R & AN-BP) and Pearson's χ^2 tests were carried out to investigate differences in allele frequencies according to centre and clinical subtype; *t*-tests were used to compare the clinical characteristics of carriers and non-carriers for each SNP. TDT was performed with an ad hoc EXCEL[®] spreadsheet (Microsoft France, Courtaboeuf, France) according to Spielman's work (Spielman et al., 1993), and *p* values <0.05 were considered statistically significant. Linkage disequilibrium was tested using the SNPalyze software (v5.1, Dynacom Co., Ltd., Kanagawa, Japan). SYSTAT 11 © (Systat Software, Inc. Richmond CA, 2004) was used for all other statistical tests.

3. Results

Genotypes and allele frequencies of the four SNPs followed Hardy-Weinberg equilibrium. Population heterogeneity among centres was excluded (*p* = 0.79 for prepro-ghrelin Gln90Leu, *p* = 0.46 for prepro-ghrelin Leu72Met, *p* = 0.20 for BDNF Val66Met and *p* = 0.42 for AgRP Ala67Thr). Gln90Leu of the prepro-ghrelin gene is not in linkage disequilibrium with the Leu72Met polymorphism located in the same gene (*r*² = 4.184E-3, 6.582E-3, and 4.606E-3 for probands, fathers and mothers respectively).

A transmission disequilibrium was observed for the Met72GHREL SNP and for the Thr67AgRP SNP (Table 1). When stratified by clinical subtype, these polymorphisms were preferentially transmitted for the trios with a

Table 1 Transmission disequilibrium test (TDT) for the SNPs in informative trios

SNPs	ANR			ANB			All		
	Transmitted/ non-transmitted	Mc Nemar χ^2	<i>p</i>	Transmitted/ non-transmitted	Mc Nemar χ^2	<i>p</i>	Transmitted/ non-transmitted	Mc Nemar χ^2	<i>p</i>
Gln90Leu-Obestatin	5/7	0.33	0.56	2/7	2.78	0.096	7/14	2.33	0.13
Leu72Met-Ghrelin	8/4	1.33	0.25	13/2	8.07	0.005	21/6	8.33	0.004
Val66Met-BDNF	15/15	0	1	10/13	0.39	0.53	25/28	0.17	0.68
Ala67Thr-AGRP	6/3	1	0.32	6/1	3.57	0.059	12/4	4	0.046

bingeing/purging proband. Transmission of preproghrelin haplotypes showed a transmission disequilibrium for the 90Gln72Met haplotype (20 transmitted for 26 informative trios, $\chi^2 = 7.54$, $p = 0.006$), preferentially for the ANB subtype (12 transmitted for 14 informative trios, $\chi^2 = 7.14$, $p = 0.008$). The frequency of the Met72GHREL allele was doubled in the ANB group with respect to ANR (OR = 2.26, IC 95 = 0.95–5.37) and the proportions were reversed for the Leu90OBE allele (OR = 0.42, IC 95 = 0.08–2.17) (Table 2). No homozygous carriers for the Leu90OBE or Thr67AgRP genes were observed. When comparing the clinical characteristics of the anorexic between carriers and non-carriers of each SNP (Table 3), carriers of the obestatin Gln90Leu polymorphism (heterozygotes plus homozygotes), had a lower lifetime minimal BMI compared with the homozygotes for the wild allele (12.4 vs. 13.6 for the wildtype, $p = 0.025$). An opposite difference was observed for Thr67AgRP carriers (15.1 vs. 13.2 for the wildtype, $p = 0.024$). Met72GHREL carriers and Met66BDNF carriers were associated with opposite statistically significant differences in the age of onset compared to the wildtype carriers (13.8 vs. 15.4yr for the Leu72GHREL wildtype, $p = 0.047$ and 16.0 vs. 14.5yr for the Val66BDNF wildtype, $p = 0.047$). Clinical severity, assessed by the EAT score, was higher in Met66BDNF carriers (32.6 vs. 25.0 for the wildtype, $p = 0.025$) and a lower sense of interpersonal distrust was associated with the Thr67AgRP allele, compared to the wild type (3.0 vs. 6.1 for the wildtype, $p = 0.002$). Clinical subtypes (i.e. ANR vs. ANB) were statistically different for almost all clinical characteristics. Therefore, 2-way ANOVA were performed for each SNP (subtype vs. allele variant). Except for the Leu90OBE polymorphism, all differences remained statistically significant ($p = 0.34$, 0.005, 0.027, 0.036, 0.010 and 0.006).

4. Discussion

This family-based analysis provides evidence for a preferential transmission of both the Leu72Met variant of the prepro-ghrelin gene and the Ala67Thr polymorphism of the AGRP gene, with, for the former, an excess of transmission of the Gln90Leu72 haplotype in patients with AN. Two recent articles (Cellini et al., 2006; Monteleone et al., 2006a) reported a lack of association of the Leu72Met variant of prepro-ghrelin with AN or bulimia nervosa, but a comparison between clinical subtypes of AN was not attempted in these two studies. We observed a preferential transmission and association of the Met72GHREL allele with the binge/purging

subtype with a seemingly higher frequency of this allele compared to the restrictive subtype. Ethnic and international variations in the ghrelin gene polymorphisms have been reported (Ukkola et al., 2002; Cellini et al., 2006; Miyasaka et al., 2006) but the frequency of the Met72GHREL variant in our population is similar to the frequency observed in other European populations of AN—11% of Met72GHREL allele compared to 6–10% in anorexia patients and 4–10% in control subjects—(Cellini et al., 2006; Monteleone et al., 2006a) and could not explain the differing results. Differences in the respective numbers of ANB and ANR enrolled in the AN populations may better explain this difference. At any rate, the functional significance of the Met72GHREL mutation remains uncertain: it lies outside the region where the mature ghrelin product is encoded (Kojima et al., 1999) but leucine at position 72 is highly conserved among the different mammalian species investigated so far (Kaiya et al., 2001) and may play a significant role in posttranslational processing. Met72GHREL carriers in the general population display the lowest BMI and the lowest fat mass; with less visceral fat and a lower fasting respiratory quotient, indicating a greater utilization of fat as an energy substrate (Ukkola et al., 2002). The Leu72Met substitution is also associated with an earlier age at onset of AN, as previously reported in obese subjects (Ukkola et al., 2001; Korbonits et al., 2002; Miraglia del Giudice et al., 2004).

The Leu90OBE variant was neither associated with AN nor with any subtype. On the contrary, there was a tendency for the Leu90OBE allele not to be transmitted in the ANB subtype ($p = 0.10$). This SNP lies in the region coding for obestatin, a recently discovered peptide derived from the same ghrelin gene but having an opposite, anorexic action (Zhang et al., 2005). Therefore, polymorphic variants of this gene might influence eating behaviour. We did not correct for multiple testing for the TDT because we did consider each SNPs transmission as a separate hypothesis. This was strengthened by the absence of linkage disequilibrium between the Leu90OBE and the Met72GHREL SNPs. Because we separately compared the clinical characteristics between carriers and non-carriers for each SNP, the probability of having more than one statistically significant association is greater than the nominal 5% level. We eschewed methods to adjust for multiple comparisons (e.g., the Bonferroni correction) since they assume statistical independence among the comparisons and tend to be too conservative, hindering exploratory findings which are biologically plausible (Perneger, 1998). Confirmatory studies are then needed to confirm these exploratory findings about clinical

Table 2 Allele frequency according to clinical subtype (restrictive–ANR vs. Bulimic/purging–ANB–)

	OBE		GHR			BDNF			AGRP			
	–90Gln	–90Leu	OR	–72Leu	–72Met	OR	–66Val	–66Met	OR	–67Ala	–67Thr	OR
			[95%CI]			[95%CI]			[95%CI]			[95%CI]
ANR n (%)	114	6 (5)		122	10 (7.6)		102	30 (22.7)		126	6 (4.5)	
ANB n (%)	90	2 (2.2)	0.42	81	15 (15.6)	2.26	77	19 (19.8)	0.84	89	7 (7.3)	1.65
			[0.08–2.22]			[0.95–5.37]			[0.43–1.62]			[0.53–5.20]

haplotypes and ANB but failed to support the participation of epistatic effects between BDNF and NTRK2 in the risk to develop eating disorders (Ribases et al., 2005a). A recent study suggested that, while the 196G/A SNP of the human BDNF gene did not contribute to the genetic susceptibility to bulimia nervosa and binge eating disorder in their population, it may predispose these patients to a more severe binge eating behaviour (Monteleone et al., 2006b). Implication of the Val66Met substitution in the pathophysiology of eating disorders remains unclear but this polymorphism has been shown to alter the intracellular trafficking and the regulated secretion of the mature BDNF (Lu, 2003).

Our results for the Ala67Thr AGRP polymorphism are in line with the case-control study of Vink et al. (2001) which revealed an increased allele frequency in AN (6% compared to 2% in the control group). In the general population, homozygous individuals for the Thr67AgRP variant allele, but not heterozygous subjects, were found to have a lower weight, BMI, fat mass and leptin levels when compared to those carrying at least one Ala67AgRP allele (Marks et al., 2004). As AGRP is an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin-4 receptor (MC4R) and stimulates feeding and weight gain, an alanine to threonine substitution at codon 67 might result in inadequate blockade of the MC4R with a consequently lower stimulation in food intake (Vink et al., 2001). But functional analysis of this polymorphism did not demonstrate a defect of Thr67AgRP related to MC4R interactions (de Rijke et al., 2005). Interestingly, in whites, Thr67AgRP heterozygous display a lower self-reported intake of fats compared to Ala67Ala subjects (Loos et al., 2005). AN is characterized by food avoidance and patients express fat aversion rather than carbohydrates fears (Drewnowski et al., 1988).

The role of the mediobasal hypothalamus in food intake and energy regulation has progressed with the discovery of many neuropeptides/lipids and their cognate receptors (neuropeptide Y, AgRP, α -MSH, CART, endocannabinoids), neurotrophic factors (BDNF, NT-3) and hormones (leptin, ghrelin, obestatin, PYY) which all impact on the intrahypothalamic regulation of body weight/feeding behaviour (Zigman and Elmquist, 2003). Further simultaneous analysis of genetic variants of these biological determinants of energy metabolism and feeding behaviour in very large populations should contribute to the explanation of the high degree of heritability of eating disorders and to the description of pathophysiological patterns leading to life-threatening conditions in a highly redundant system.

Acknowledgements

This work was supported by grants from EC (Factors in Healthy Eating) and INSERM.

Appendix A. Supplementary materials

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.psyneuen.2006.11.003.

References

- American Psychiatric Association and American Psychiatric Association Task Force on DSM-IV, 1994. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV. American Psychiatric Association, Washington, DC.
- Beck, A.T., Beamesderfer, A., 1974. Assessment of depression: the depression inventory. *Mod. Probl. Pharmacopsychiatry* 7, 151–169.
- Bender, R., Lange, S., 1999. Multiple test procedures other than Bonferroni's deserve wider use. *Br. Med. J.* 318, 600–601.
- Cellini, E., Nacmias, B., Brecelj-Anderluh, M., Badia-Casanovas, A., Bellodi, L., Boni, C., Di Bella, D., Estivill, X., Fernandez-Aranda, F., Foulon, C., Friedel, S., Gabrovsek, M., Gorwood, P., Gratacos, M., Guelfi, J., Hebebrand, J., Hinney, A., Holliday, J., Hu, X., Karwautz, A., Kipman, A., Komel, R., Rotella, C.M., Ribases, M., Ricca, V., Romo, L., Tomori, M., Treasure, J., Wagner, G., Collier, D.A., Sorbi, S., 2006. Case-control and combined family trios analysis of three polymorphisms in the ghrelin gene in European patients with anorexia and bulimia nervosa. *Psychiatr. Genet.* 16, 51–52.
- de Krom, M., Bakker, S.C., Hendriks, J., van Elburg, A., Hoogendoorn, M., Verduijn, W., Sinke, R., Kahn, R., Adan, R.A., 2005. Polymorphisms in the brain-derived neurotrophic factor gene are not associated with either anorexia nervosa or schizophrenia in Dutch patients. *Psychiatr. Genet.* 15, 81.
- de Rijke, C.E., Jackson, P.J., Garner, K.M., van Rozen, R.J., Douglas, N.R., Kas, M.J., Millhauser, G.L., Adan, R.A., 2005. Functional analysis of the Ala67Thr polymorphism in agouti related protein associated with anorexia nervosa and leanness. *Biochem. Pharmacol.* 70, 308–316.
- Devlin, B., Roeder, K., Bacanu, S.A., 2001. Unbiased methods for population-based association studies. *Genet. Epidemiol.* 21, 273–284.
- Drewnowski, A., Pierce, B., Halmi, K.A., 1988. Fat aversion in eating disorders. *Appetite* 10, 119–131.
- Friedel, S., Horro, F.F., Wermter, A.K., Geller, F., Dempfle, A., Reichwald, K., Smidt, J., Bronner, G., Konrad, K., Herpertz-Dahlmann, B., Warnke, A., Hemminger, U., Linder, M., Kiefl, H., Goldschmidt, H.P., Siegfried, W., Remschmidt, H., Hinney, A., Hebebrand, J., 2005. Mutation screen of the brain derived neurotrophic factor gene (BDNF): identification of several genetic variants and association studies in patients with obesity, eating disorders, and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 132, 96–99.
- Garner, D.M., Olmsted, M.P., Bohr, Y., Garfinkel, P.E., 1982. The eating attitudes test: psychometric features and clinical correlates. *Psychol. Med.* 12, 871–878.
- Garner, D.M., Olmsted, M.P., Polivy, J., 1983. Development and validation of a multidimensional eating disorder inventory for anorexia nervosa and bulimia. *Int. J. Eating Disorders* 2, 15–34.
- Gorwood, P., 1999. Genetic association studies in behavioral neuroscience. In: Cruzio, W., Gerlai, R. (Eds.), *Molecular Genetic Techniques for Behavioural Neuroscience*. Elsevier, Amsterdam, pp. 113–121.
- Gorwood, P., Kipman, A., Foulon, C., 2003. The human genetics of anorexia nervosa. *Eur. J. Pharmacol.* 480, 163–170.
- Hashimoto, K., Koizumi, H., Nakazato, M., Shimizu, E., Iyo, M., 2005. Role of brain-derived neurotrophic factor in eating disorders: recent findings and its pathophysiological implications. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 499–504.
- Hinney, A., Hoch, A., Geller, F., Schafer, H., Siegfried, W., Goldschmidt, H., Remschmidt, H., Hebebrand, J., 2002. Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 2716.

- Hoek, H.W., van Hoeken, D., 2003. Review of the prevalence and incidence of eating disorders. *Int. J. Eating Disorders* 34, 383–396.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Koda, A., Yamamoto, K., Kitajima, Y., Matsumoto, M., Minamitake, Y., Kikuyama, S., Kangawa, K., 2001. Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue. *J. Biol. Chem.* 276, 40441–40448.
- Klump, K.L., Gobrogge, K.L., 2005. A review and primer of molecular genetic studies of anorexia nervosa. *Int. J. Eating Disorders* 37 (Suppl.), S43–S48 discussion S87–9.
- Koizumi, H., Hashimoto, K., Itoh, K., Nakazato, M., Shimizu, E., Ohgake, S., Koike, K., Okamura, N., Matsushita, S., Suzuki, K., Murayama, M., Higuchi, S., Iyo, M., 2004. Association between the brain-derived neurotrophic factor 196G/A polymorphism and eating disorders. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 127, 125–127.
- 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.
- Korbonits, M., Gueorguiev, M., O'Grady, E., Lecoq, C., Swan, D.C., Mein, C.A., Weill, J., Grossman, A.B., Froguel, P., 2002. A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 4005–4008.
- Larsen, L.H., Gjesing, A.P., Sorensen, T.I., Hamid, Y.H., Echwald, S.M., Toubro, S., Black, E., Astrup, A., Hansen, T., Pedersen, O., 2005. Mutation analysis of the preproghrelin gene: no association with obesity and type 2 diabetes. *Clin. Biochem.* 38, 420–424.
- Loos, R.J., Rankinen, T., Rice, T., Rao, D.C., Leon, A.S., Skinner, J.S., Bouchard, C., Argyropoulos, G., 2005. Two ethnic-specific polymorphisms in the human Agouti-related protein gene are associated with macronutrient intake. *Am. J. Clin. Nutr.* 82, 1097–1101.
- Lu, B., 2003. Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. *Neuron* 39, 735–738.
- Marks, D.L., Boucher, N., Lanouette, C.M., Perusse, L., Brookhart, G., Comuzzie, A.G., Chagnon, Y.C., Cone, R.D., 2004. Ala67Thr polymorphism in the Agouti-related peptide gene is associated with inherited leanness in humans. *Am. J. Med. Genet. A* 126, 267–271.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215.
- Miraglia del Giudice, E., Santoro, N., Cirillo, G., Raimondo, P., Grandone, A., D'Aniello, A., Di Nardo, M., Perrone, L., 2004. Molecular screening of the ghrelin gene in Italian obese children: the Leu72Met variant is associated with an earlier onset of obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disorders* 28, 447–450.
- Miyasaka, K., Hosoya, H., Sekime, A., Ohta, M., Amono, H., Matsushita, S., Suzuki, K., Higuchi, S., Funakoshi, A., 2006. Association of ghrelin receptor gene polymorphism with bulimia nervosa in a Japanese population. *J. Neural Transm.* 113, 1279–1285.
- Monteleone, P., Tortorella, A., Castaldo, E., Di Filippo, C., Maj, M., 2006a. No association of the Arg51Gln and Leu72Met polymorphisms of the ghrelin gene with anorexia nervosa or bulimia nervosa. *Neurosci. Lett.* 398, 325–327.
- Monteleone, P., Zanardini, R., Tortorella, A., Gennarelli, M., Castaldo, E., Canestrelli, B., Maj, M., 2006b. The 196G/A (val66met) polymorphism of the BDNF gene is significantly associated with binge eating behavior in women with bulimia nervosa or binge eating disorder. *Neurosci. Lett.* 406, 133–137.
- 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.
- Nurnberger Jr., J.I., Blehar, M.C., Kaufmann, C.A., York-Cooler, C., Simpson, S.G., Harkavy-Friedman, J., Severe, J.B., Malaspina, D., Reich, T., 1994. Diagnostic interview for genetic studies. Rationale, unique features, and training. NIMH Genetics Initiative. *Arch. Gen. Psychiatry* 51, 849–859 discussion 863–4.
- Otto, B., Cuntz, U., Fruehauf, E., Wawarta, R., Folwaczny, C., Riepl, R.L., Heiman, M.L., Lehnert, P., Fichter, M., Tschop, M., 2001. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur. J. Endocrinol.* 145, 669–673.
- Perneger, T.V., 1998. What's wrong with Bonferroni adjustments. *Br. Med. J.* 316, 1236–1238.
- Ribases, M., Gratacos, M., Armengol, L., de Cid, R., Badia, A., Jimenez, L., Solano, R., Vallejo, J., Fernandez, F., Estivill, X., 2003. Met66 in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) precursor is associated with anorexia nervosa restrictive type. *Mol. Psychiatry* 8, 745–751.
- Ribases, M., Gratacos, M., Fernandez-Aranda, F., Bellodi, L., Boni, C., Anderlueh, M., Cavallini, M.C., Cellini, E., Di Bella, D., Erzegovesi, S., Foulon, C., Gabrovsek, M., Gorwood, P., Hebebrand, J., Hinney, A., Holliday, J., Hu, X., Karwautz, A., Kipman, A., Komel, R., Nacmias, B., Remschmidt, H., Ricca, V., Sorbi, S., Wagner, G., Treasure, J., Collier, D.A., Estivill, X., 2004. Association of BDNF with anorexia, bulimia and age of onset of weight loss in six European populations. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1205–1212.
- Ribases, M., Gratacos, M., Badia, A., Jimenez, L., Solano, R., Vallejo, J., Fernandez-Aranda, F., Estivill, X., 2005a. Contribution of NTRK2 to the genetic susceptibility to anorexia nervosa, harm avoidance and minimum body mass index. *Mol. Psychiatry* 10, 851–860.
- Ribases, M., Gratacos, M., Fernandez-Aranda, F., Bellodi, L., Boni, C., Anderlueh, M., Cristina Cavallini, M., Cellini, E., Di Bella, D., Erzegovesi, S., Foulon, C., Gabrovsek, M., Gorwood, P., Hebebrand, J., Hinney, A., Holliday, J., Hu, X., Karwautz, A., Kipman, A., Komel, R., Nacmias, B., Remschmidt, H., Ricca, V., Sorbi, S., Tomori, M., Wagner, G., Treasure, J., Collier, D.A., Estivill, X., 2005b. Association of BDNF with restricting anorexia nervosa and minimum body mass index: a family-based association study of eight European populations. *Eur. J. Hum. Genet.* 13, 428–434.
- Shimizu, E., Hashimoto, K., Iyo, M., 2004. Ethnic difference of the BDNF 196G/A (val66met) polymorphism frequencies: the possibility to explain ethnic mental traits. *Am. J. Med. Genet. B: Neuropsychiatr. Genet.* 126, 122–123.
- Shuto, Y., Shibasaki, T., Otagiri, A., Kuriyama, H., Ohata, H., Tamura, H., Kamegai, J., Sugihara, H., Oikawa, S., Wakabayashi, I., 2002. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J. Clin. Invest.* 109, 1429–1436.
- Spielman, R.S., McGinnis, R.E., Ewens, W.J., 1993. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am. J. Hum. Genet.* 52, 506–516.
- Steinle, N.I., Pollin, T.I., O'Connell, J.R., Mitchell, B.D., Shuldiner, A.R., 2005. Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the Old Order Amish. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 6672–6677.
- Sullivan, P.F., 1995. Mortality in anorexia nervosa. *Am. J. Psychiatry* 152, 1073–1074.
- Tanaka, M., Nakahara, T., Kojima, S., Nakano, T., Muranaga, T., Nagai, N., Ueno, H., Nakazato, M., Nozoe, S., Naruo, T., 2004. Effect of nutritional rehabilitation on circulating ghrelin and growth hormone levels in patients with anorexia nervosa. *Regul. Pept.* 122, 163–168.
- Tolle, V., Kadem, M., Bluet-Pajot, M.T., Frere, D., Foulon, C., Bossu, C., Dardennes, R., Mounier, C., Zizzari, P., Lang, F., Epelbaum, J., Estour, B., 2003. Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 109–116.

- Tozzi, F., Thornton, L.M., Klump, K.L., Fichter, M.M., Halmi, K.A., Kaplan, A.S., Strober, M., Woodside, D.B., Crow, S., Mitchell, J., Rotondo, A., Mauri, M., Cassano, G., Keel, P., Plotnicov, K.H., Pollice, C., Lilenfeld, L.R., Berrettini, W.H., Bulik, C.M., Kaye, W.H., 2005. Symptom fluctuation in eating disorders: correlates of diagnostic crossover. *Am. J. Psychiatry* 162, 732–740.
- Ukkola, O., Ravussin, E., Jacobson, P., Snyder, E.E., Chagnon, M., Sjostrom, L., Bouchard, C., 2001. Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 3996–3999.
- Ukkola, O., Ravussin, E., Jacobson, P., Perusse, L., Rankinen, T., Tschop, M., Heiman, M.L., Leon, A.S., Rao, D.C., Skinner, J.S., Wilmore, J.H., Sjostrom, L., Bouchard, C., 2002. Role of ghrelin polymorphisms in obesity based on three different studies. *Obes. Res.* 10, 782–791.
- Vink, T., Hinney, A., van Elburg, A.A., van Goozen, S.H., Sandkuijl, L.A., Sinke, R.J., Herpertz-Dahlmann, B.M., Hebebrand, J., Remschmidt, H., van Engeland, H., Adan, R.A., 2001. Association between an agouti-related protein gene polymorphism and anorexia nervosa. *Mol. Psychiatry* 6, 325–328.
- Vivenza, D., Rapa, A., Castellino, N., Bellone, S., Petri, A., Vacca, G., Aimaretti, G., Broglio, F., Bona, G., 2004. Ghrelin gene polymorphisms and ghrelin, insulin, IGF-I, leptin and anthropometric data in children and adolescents. *Eur. J. Endocrinol.* 151, 127–133.
- Wajnrach, M.P., Gertner, J.M., Sokoloff, A.S., Ten, I., Harbison, M.D., Netchine, I., Maheshwari, H.G., Goldstein, D.B., Amselem, S., Baumann, G., Leibel, R.L., 2003. Haplotype analysis of the growth hormone releasing hormone receptor locus in three apparently unrelated kindreds from the Indian subcontinent with the identical mutation in the GHRH receptor. *Am. J. Med. Genet. A* 120, 77–83.
- Wren, A.M., Seal, L.J., Cohen, M.A., Brynes, A.E., Frost, G.S., Murphy, K.G., Dhillo, W.S., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2001. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5992.
- Zhang, J.V., Ren, P.G., Avsian-Kretchmer, O., Luo, C.W., Rauch, R., Klein, C., Hsueh, A.J., 2005. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310, 996–999.
- Zigman, J.M., Elmquist, J.K., 2003. Minireview: from anorexia to obesity—the yin and yang of body weight control. *Endocrinology* 144, 3749–3756.

L'anorexie mentale qui touche principalement la femme se manifeste par un comportement de restriction alimentaire volontaire dont les causes sont mal définies. Un certain nombre d'études suggère qu'il existerait une vulnérabilité biologique en partie héritable (Bulik *et al.*, 2000; Hebebrand et Remschmidt, 1995; Kipman *et al.*, 1999). Les études sur les jumeaux rapportent généralement un meilleur taux de concordance pour les jumeaux monozygotes que pour les jumeaux dizygotes ce qui suggère que ce sont principalement les facteurs génétiques plutôt que les facteurs environnementaux qui expliquent pourquoi certaines familles sont plus touchées par la maladie (Kipman *et al.*, 1999). Par ailleurs dans les études familiales l'anorexie mentale serait 10 fois plus observée chez les apparentés au premier degré de femmes anorexiques que chez des sujets témoins (Strober *et al.*, 2000). Néanmoins, au bout de trois générations, le risque est ramené à celui de la population générale, ce qui laisse supposer que cette maladie a une composante polygénétique ; en effet plus le nombre de gènes est élevé plus la dispersion de la maladie à la génération suivante est importante.

Il est raisonnable de penser que cette vulnérabilité biologique pourrait passer par les gènes codant pour des hormones ou des neuromédiateurs impliqués dans la régulation du comportement alimentaire. Parmi ces gènes, celui de la ghreline semble être un bon candidat étant donné le rôle de cette hormone dans le contrôle de la prise alimentaire. Deux polymorphismes dans le gène de la preproghreline ont été précédemment identifiés chez des patients obèses : le polymorphisme Leu 72 Met dont les porteurs semblent protégés contre l'accumulation de graisse (Ukkola *et al.*, 2002) et le polymorphisme Gln 90 Leu qui est situé dans la région codant pour l'obestatine, protéine qui aurait une action anorexigène (Zhang *et al.*, 2005). Nous avons donc recherché chez des patientes anorexiques et leurs parents la présence de ces 2 polymorphismes ainsi que la présence du polymorphisme Ala 67 Thr de l'AgRP et du polymorphisme Val 66 Met du BDNF (ces deux derniers ont récemment été associés à l'anorexie (Hashimoto *et al.*, 2005; Ribases *et al.*, 2005; Vink *et al.*, 2001).

L'analyse de la contribution génétique à un phénotype complexe peut être envisagée par trois types d'approches :

- les études d'association ou encore étude cas-contrôle
- les études de liaison

○ le test de déséquilibre de transmission

Nous avons choisi le test de déséquilibre de transmission car il permet d'éviter les problèmes de stratification inhérente aux études cas-contrôle (Spielman, 1993). Ce test utilise des trio-familiaux, composés du patient et des deux parents. Les allèles parentaux non transmis servent de contrôle interne. La fréquence de transmission d'un allèle, des parents à leur enfant est comparée à la fréquence de non transmission. Si l'allèle analysé est transmis plus fréquemment qu'attendu par le hasard, cet allèle ou un allèle situé à proximité peut prédisposer à la maladie. Si au contraire la transmission est moins importante que celle attendu, cet allèle pourrait avoir une action protectrice. Ce test prend en compte l'hétérogénéité génétique.

114 patientes anorexiques et leurs parents ont fait l'objet de cette étude dans laquelle nous avons recherché la présence des 4 polymorphismes d'intérêt et évalué leur transmission et leur association éventuelle avec des facteurs cliniques. Les résultats et leurs commentaires sont présentés dans l'article 6.

En résumé :

- Seuls les polymorphismes Leu 72 Met de la preproghrelina et Ala 67 Thr de l'AgRP présentent un déséquilibre de transmission :

- Leu 72 Met : 21 transmis, 6 non transmis, $p=0,004$

- Ala 67 Thr : 12 transmis, 4 non transmis, $p=0,046$

- Une transmission préférentielle est observée dans le groupe de patientes anorexiques boulimiques (ANB) par rapport aux patientes anorexiques restrictives (ANR) :

- Leu 72 Met : ANR 8 Transmis, 4 non transmis, $p=0,25$; ANB 13 transmis, 2 non transmis $p=0,004$.

- Ala 67 Thr : ANR 6 transmis, 3 non transmis, $p=0,032$; ANB 6 transmis, 1 non transmis, $p=0,059$.

- La caractérisation phénotypique de chaque proband en fonction de la présence de tel ou tel polymorphisme a permis d'associer :

- un BMI minimum inférieur chez les porteurs des polymorphismes Gln 90 Leu de la preproghrelina et Ala 67 Thr de l'AgRP.

- un âge de début de la maladie inférieur chez les porteurs du polymorphisme Leu 72 Met de la preproghrelina et Val 66 Met du BDNF.

Un certain nombre de questions se posent maintenant :

- Le polymorphisme Leu 72 Met est situé entre la séquence codant pour la ghrelina et celle codant pour l'obestatine alors que le polymorphisme Gln 90 Leu est situé au sein de la séquence codant pour l'obestatine. Il serait intéressant de rechercher si chez les patientes anorexiques, les altérations de séquence observées peuvent entraîner

- des modifications de la maturation de la preproghrelina en ghrelina et obestatine. Est-ce que le rapport ghrelina/obestatine est différent chez les personnes porteuses du polymorphisme Leu 72 Met et si oui quelle en est la conséquence ?

- une modification de l'activité de l'obestatine. En effet il a été précédemment montré que la présence d'un polymorphisme peut induire ou non une modification de l'activité de la protéine : réduction (Li *et al.*, 2006), gain de fonction (De Gobbi *et al.*, 2006; Glatt *et al.*, 2006) ou aucune modification (de Rijke *et al.*, 2005).

- Est-ce que la présence d'un polymorphisme ou d'un groupe de polymorphismes peut permettre de prédire le devenir des patientes, notamment le risque de rechute ? Une étude effectuée 6 ans après le début de la thérapie rapporte 34,7% de bon rétablissement, 38,6% de rétablissement intermédiaire. 20,8% de rétablissement médiocre et 5,9% de décès (Fichter et Quadflieg, 1999). Si les risques de rechute peuvent être évalués peut on les anticiper ?

**CONCLUSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSIONS

Les expériences que nous avons conduites au cours de ce travail de thèse avaient pour but :

- De rechercher le rôle de la ghreline endogène dans la régulation de deux fonctions étroitement liées, la fonction somatotrope et le comportement alimentaire.
- D'évaluer en retour si ces deux fonctions influencent la libération de ghreline.
- De rechercher si la vulnérabilité de certains sujets vis-à-vis de l'anorexie pouvait être associée à la présence de polymorphismes dans le gène de la ghreline.

Les principaux résultats que nous avons obtenus montrent que :

- La sécrétion de ghreline ainsi que celle d'obestatine, un peptide issu du même précurseur, sont rythmiques.
- Les sécrétions de ghreline et de GH sont peu corrélées alors que les pics de ghreline sont plus en relation avec les épisodes de prise alimentaire. Néanmoins, la ghreline endogène jouerait bien un rôle dans la modulation de l'amplitude du pic de GH, comme le montrent les résultats obtenus avec un antagoniste du récepteur GHSR1a. Par contre lors du traitement à court terme par cet antagoniste aucune modification significative de la prise alimentaire n'est observée ce qui suggère que les différents effets de la ghreline pourraient mettre en jeu soit le GHSR1a dans des états d'activation différente soit des récepteurs différents.
- Les taux de ghreline dépendent plus de l'état nutritionnel que de la masse grasse et ils seraient régulés, entre autres, par des facteurs présents dans l'intestin. Une dérégulation de ce dernier système pourrait participer au développement de l'obésité. Par contre l'incidence de modifications des taux de GH sur ceux de ghreline n'a pu être mise en évidence dans nos conditions expérimentales.
- Chez l'anorexique, sur les deux polymorphismes de la prepro-ghreline étudiés, Leu72Met et Gln90Leu, seul le premier présente un déséquilibre de transmission et ce déséquilibre est plus marqué chez les patientes anorexiques boulimiques que chez les patientes anorexiques restrictives.

PERSPECTIVES

1) Sécrétion spontanée de ghreline et d'obestatine.

Ghreline et obestatine, qui sont issues du même précurseur, sont toutes deux libérées de façon rythmique mais il n'existe pas de corrélation stricte entre taux de ghreline et taux d'obestatine et la fréquence d'apparition des pics est plus faible pour l'obestatine que pour la ghreline suggérant l'existence de régulations différentes de la synthèse et/ou de la libération de ces 2 peptides. Ces résultats posent au moins 2 problèmes qui devront être résolus avant de vérifier cette hypothèse :

a) La ghreline octanoylée est très rapidement dégradée dans le sang. Sa demi-vie, estimée par comparaison avec celle de ghreline exogène injectée en intraveineux, est très courte, probablement inférieur à 10 minutes. Est-ce que nous observerions une meilleure corrélation entre taux de ghreline et taux d'obestatine si les prélèvements sanguins étaient effectués au moins toutes les 10 minutes au lieu de 20 ou 30 minutes ?

b) Quelle forme de ghreline est réellement mesurée?

Dans cette étude nous avons utilisé 2 anticorps : l'un dirigé contre la partie C terminale qui devrait reconnaître à la fois la ghreline octanoylée et la non octanoylée ce que nous avons nommé « ghreline totale », l'autre dirigé contre la partie N terminale qui ne détecte que la forme octanoylée.

Une étude récente montre que la majorité de la ghreline octanoylée circule associée à une protéine de haut poids moléculaire et qu'un anticorps dirigé contre la partie N terminale reconnaît à la fois la ghreline octanoylée libre et liée alors qu'un anticorps dirigé contre la partie C terminale ne détecte pas la forme octanoylée liée (Patterson *et al.*, 2005). Qu'en est-il des anticorps que nous avons utilisés ? Pour répondre à cette question les différentes formes non octanoylée, octanoylée libre, octanoylée liée de différents plasmas séparées par passage sur colonne de sephadex seront évaluées avec nos 2 anticorps afin de définir avec précision ce que nous déterminons. Si notre anticorps dirigé contre la partie C terminale ne détecte pas la forme octanoylée liée les mesures de « ghreline totale » que nous avons effectuées ne correspondent donc pas à la quantité totale réelle de ghreline. Parallèlement il serait intéressant de mettre au point un dosage de la forme non octanoylée.

L'absence de corrélation stricte entre taux de ghreline et taux d'obestatine, si elle est confirmée, et leur régulation de manière opposée par l'état nutritionnel telle que suggérée par

nos premiers résultats posent alors plusieurs questions : est-ce que ghreline et obestatine sont maturées par les mêmes protéines convertases ? sont elles maturées dans les mêmes compartiments ou dans des compartiments différents ? sont elles produites par les mêmes cellules ? Est ce que leur libération est régulée par les mêmes facteurs ?

La pro-hormone convertase PC1/3 semble impliquée dans la maturation de la pro-ghreline en ghreline et en obestatine puisque qu'en son l'absence, il n'y a plus formation des produits de maturation. Si PC1/3 est suffisante pour la maturation de la ghreline octanoylée, qu'en est-il pour l'obestatine ? Est-ce que le clivage par PC1/3 permet de libérer un site qui sera accessible par d'autres protéines convertases. La maturation de l'obestatine pourra être comparée chez des souris sauvages ou invalidées pour les gènes d'autres pro-hormones convertases, comme PC2 et PC5/6.

Nous localiserons à la fois la ghreline et l'obestatine au niveau de l'estomac par double marquage en immuno-histochimie pour déterminer leur lieu de synthèse.

Un éventuel effet sur la sécrétion d'obestatine de différents facteurs déjà connus pour moduler celle de ghreline (insuline, glucose, SRIH, GH...) sera recherché en utilisant un système de périfusion d'estomac.

Enfin les résultats que nous avons obtenus chez le rat Zucker, suggèrent que un ou des signaux originaires de l'intestin contribuent à la régulation de la sécrétion de ghreline suite à l'ingestion de nutriments et qu'une dérégulation de ces signaux pourrait être à l'origine de l'hyperphagie observée chez cet animal. Pour identifier ce ou ces signaux nous envisageons d'utiliser une approche par puces à ADN et des intestins provenant de rats normaux et obèses. Si nous parvenons à identifier un facteur nous évaluerons son effet sur la libération d'obestatine et nous tenterons ensuite de le bloquer, soit par ARN interférence soit par immunisation pour vérifier son implication dans l'obésité.

2) Ghreline/ obestatine et GH

Alors que les injections de ghreline stimulent très fortement la sécrétion de GH, nous n'avons pas observé de relation stricte entre les pics de ghreline et ceux de GH comme nous aurions pu l'attendre. Par ailleurs il ne semble pas non plus y avoir de relation entre taux d'obestatine et de GH. Nous devons maintenant vérifier si:

a) cette absence de corrélations persiste lorsque les prélèvements sont effectués à des temps plus rapprochés ?

b) la ghreline octanoylée libre, qui est probablement la seule directement accessible à sa cible, est plus fortement corrélée avec la GH que ne l'est la ghreline octanoylée dans son ensemble ?

L'augmentation de la sécrétion de GH après administration de ghreline est due à un blocage de l'action de la somatostatine et à une augmentation de la libération de GHRH. Il est possible qu'au-delà d'un certain seuil la ghreline ne soit plus capable de bloquer suffisamment l'action de la somatostatine pour permettre à la GHRH de stimuler la GH et dans ce cas la ghreline augmenterait seulement l'amplitude des pics de GH qui apparaîtraient en même temps qu'un pic de ghreline. Nous rechercherons donc si les pics de GH qui suivent un pic de ghreline octanoylée libre ont une amplitude plus importante. Par ailleurs à l'heure actuelle la majorité des études conduites chez l'animal, le sont chez le mâle. Or chez la femelle les niveaux de somatostatine sont plus bas (Murray *et al.*, 1999) et le taux d'expression du GHS-R1a serait plus élevé notamment au niveau des neurones à SRIH. Il serait donc intéressant de reconduire ces expériences chez la femelle.

3) Ghreline/obestatine et prise alimentaire

Nous avons observé une relation plus étroite entre variations des taux de ghreline et épisode de prise alimentaire puisque dans près de 75% des cas un épisode de prise alimentaire est précédé par une augmentation des taux de ghreline et suivi par une diminution de ces taux. Il sera intéressant de regarder si cette relation persiste avec les taux de ghreline octanoylée libre.

Néanmoins tous les pics de ghreline ne correspondent pas à des épisodes de prise alimentaire ce qui laisse supposer que, comme pour son action sur la GH, la ghreline endogène ne peut être efficace sur le comportement alimentaire que dans certaines conditions. Il est donc aussi envisageable que la ghreline ne soit capable d'activer les neurones orexigènes que lorsque le tonus inhibiteur exercé par exemple par la leptine et/ou l'insuline est inférieur à un certain seuil.

Une autre hypothèse est maintenant envisageable avec la découverte de l'obestatine. En effet l'obestatine, dont le rôle propre sur la prise alimentaire reste encore à définir clairement, semble par contre capable de bloquer l'effet orexigène de la ghreline. Il est donc possible que la ghreline ne puisse initier un repas qu'en dessous d'un certain taux d'obestatine. La détermination des taux de ghreline et d'obestatine dans les conditions envisagées ci-dessus et donc du rapport ghreline/obestatine en parallèle avec l'observation des épisodes de prise alimentaire nous permettra de confirmer ou infirmer cette hypothèse.

4) Mode d'action de l'obestatine

Nous avons montré que l'obestatine est capable dans certaines conditions de bloquer l'effet de la ghreline sur la sécrétion de GH et sur la prise alimentaire. Nous devons maintenant déterminer par quel récepteur et par quels mécanismes.

Récemment, plusieurs équipes ont montré que, contrairement à ce qui avait été publié en même temps que sa découverte, l'obestatine n'est pas capable de se fixer et d'activer le récepteur GPR39 (Holst *et al.*, 2006; Lauwers *et al.*, 2006; Tremblay *et al.*, 2006). Pour tenter d'identifier le récepteur de l'obestatine, un criblage par expression fonctionnelle d'une banque d'ADNc dans une lignée cellulaire en culture pourrait être réalisé. La fixation de l'obestatine à son récepteur entraînant une activation du calcium intracellulaire (Dun *et al.*, 2006), une sonde fluorescente comme le fura2 pourrait être utilisée pour identifier le clone contenant ce récepteur.

Les voies neuronales activées ou inhibées par l'obestatine seront recherchées par 2 approches :

- In vivo après injection d'obestatine détection des neurones dans lesquels l'activité cfos est modifiée. Dans ce modèle la co-administration de ghreline et d'obestatine pourra nous indiquer si l'obestatine agit en bloquant les mêmes voies que celles qui sont activées par la ghreline ou si elle agit via d'autres voies
- In vitro dans un système d'hypothalami en perfusion et mesure de la libération de SRIH, GHRH, NPY, CRH etc... en présence ou non d'obestatine.

Lorsque ces populations neuronales auront été identifiées, l'utilisation de souris chez lesquelles un type neuronal particulier aura été marqué avec une protéine fluorescente de type eGFP (GHRH-eGFP, POMC-eGFP, NPY-eGFP ...) pourrait permettre de caractériser le mode d'action de l'obestatine au niveau cellulaire.

5) Rôle de la ghreline et de l'obestatine au cours du développement.

Un certain nombre d'études rapportent qu'au cours du développement, période où les circuits neuroendocriniens ne sont pas encore matures, des altérations d'hormones dépendantes de l'état nutritionnel comme la leptine peuvent affecter la mise en place des circuits neuronaux impliqués dans le contrôle de certaines sécrétions hormonales et de l'homéostasie énergétique et conduire à une altération de ces fonctions chez l'adulte. Est-ce que ghreline et obestatine pour lesquelles un pic de libération est observé juste après la

naissance participent à la mise en place de tels réseaux et donc pourraient en cas d'altération être impliquées dans le développement par exemple de troubles du comportement alimentaire ? Pour répondre à cette question nous utiliserons des souris invalidées pour le gène de la ghreline qui recevront ou non un traitement substitutif de ghreline ou obestatine.

6) Incidences de la présence du polymorphisme Leu72Met chez les patientes anorexiques

Le polymorphisme Leu72Met qui présente un déséquilibre de transmission chez les anorexiques est situé entre la séquence codant pour la ghreline et celle codant pour l'obestatine. Il serait intéressant de rechercher si chez ces patientes, les altérations de séquence observées entraînent :

- des modifications de la maturation de la preproghreline en ghreline et obestatine. Est-ce que le rapport ghreline/obestatine est différent chez les personnes porteuses du polymorphisme Leu 72 Met et si oui quelles en sont les conséquences ?

- une modification de l'activité de l'obestatine. En effet il a été précédemment montré que la présence d'un polymorphisme peut induire ou non une modification de l'activité de la protéine : réduction (Li *et al.*, 2006), gain de fonction (De Gobbi *et al.*, 2006; Glatt *et al.*, 2006) ou aucune modification (de Rijke *et al.*, 2005).

Est-ce que la présence d'un polymorphisme ou d'un groupe de polymorphismes peut permettre de prédire le devenir des patientes, notamment le risque de rechute ? Une étude effectuée 6 ans après le début de la thérapie rapporte 34,7% de bon rétablissement, 38,6% de rétablissement intermédiaire, 20,8% de rétablissement médiocre et 5,9% de décès (Fichter et Quadflieg, 1999). Si les risques de rechute peuvent être évalués peut on les anticiper ?

BIBLIOGRAPHIE

Abbott C. R., Rossi M., Wren A. M., *et al.* (2001), Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology*, **142**, 8, pp. 3457-63.

Abbott C. R., Small C. J., Kennedy A. R., *et al.* (2005), Blockade of the neuropeptide Y Y2 receptor with the specific antagonist BIIE0246 attenuates the effect of endogenous and exogenous peptide YY(3-36) on food intake. *Brain Res*, **1043**, 1-2, pp. 139-44.

Abe H., Molitch M. E., Van Wyk J. J., *et al.* (1983), Human growth hormone and somatomedin C suppress the spontaneous release of growth hormone in unanesthetized rats. *Endocrinology*, **113**, 4, pp. 1319-24.

Abe M., Saito M., Shimazu T. (1990), Neuropeptide Y in the specific hypothalamic nuclei of rats treated neonatally with monosodium glutamate. *Brain Res Bull*, **24**, 2, pp. 289-91.

Adams E. F., Huang B., Buchfelder M., *et al.* (1998), Presence of growth hormone secretagogue receptor messenger ribonucleic acid in human pituitary tumors and rat GH3 cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 2, pp. 638-42.

Adrian T. E., Ferri G. L., Bacarese-Hamilton A. J., *et al.* (1985), Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*, **89**, 5, pp. 1070-7.

Akamizu T., Shinomiya T., Irako T., *et al.* (2005), Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**, 1, pp. 6-9.

Alonso G., Tapia-Arancibia L., Assenmacher I. (1985), Electron microscopic immunocytochemical study of somatostatin neurons in the periventricular nucleus of the rat hypothalamus with special reference to their relationships with homologous neuronal processes. *Neuroscience*, **16**, 2, pp. 297-306.

Arimura A., Sato H., Dupont A., *et al.* (1975), Somatostatin: abundance of immunoreactive hormone in rat stomach and pancreas. *Science*, **189**, 4207, pp. 1007-9.

Arisawa M., Snyder G. D., De Palatis L., *et al.* (1989), Role of substance P in suppressing growth hormone release in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 18, pp. 7290-4.

Ariyasu H., Takaya K., Tagami T., *et al.* (2001), Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 10, pp. 4753-8.

Arvat E., Di Vito L., Broglio F., *et al.* (2000), Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *J Endocrinol Invest*, **23**, 8, pp. 493-5.

Arvat E., Maccario M., Di Vito L., *et al.* (2001), Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 3, pp. 1169-74.

Asakawa A., Inui A., Fujimiya M., *et al.* (2005), Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*, **54**, 1, pp. 18-24.

Asakawa A., Inui A., Kaga T., *et al.* (2003), Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut*, **52**, 7, pp. 947-52.

Asakawa A., Inui A., Kaga T., *et al.* (2001), A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. *Neuroendocrinology*, **74**, 3, pp. 143-7.

Asakawa A., Inui A., Kaga T., *et al.* (2001), Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*, **120**, 2, pp. 337-45.

Ashford M. L., Boden P. R., Treherne J. M. (1990), Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. *Pflugers Arch*, **415**, 4, pp. 479-83.

Asnicar M. A., Smith D. P., Yang D. D., *et al.* (2001), Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet. *Endocrinology*, **142**, 10, pp. 4394-400.

Avram A. M., Jaffe C. A., Symons K. V., *et al.* (2005), Endogenous circulating ghrelin does not mediate growth hormone rhythmicity or response to fasting. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**, 5, pp. 2982-7.

Bado A., Levasseur S., Attoub S., *et al.* (1998), The stomach is a source of leptin. *Nature*, **394**, 6695, pp. 790-3.

Bagnasco M., Kalra P. S., Kalra S. P. (2002), Ghrelin and leptin pulse discharge in fed and fasted rats. *Endocrinology*, **143**, 2, pp. 726-9.

Bai F. L., Yamano M., Shiotani Y., *et al.* (1985), An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res*, **331**, 1, pp. 172-5.

Baldanzi G., Filigheddu N., Cutrupi 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**, 6, pp. 1029-37.

Bale T. L., Contarino A., Smith G. W., *et al.* (2000), Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet*, **24**, 4, pp. 410-4.

Balligand J. L., Brichard S. M., Brichard V., *et al.* (1998), Hypoleptinemia in patients with anorexia nervosa: loss of circadian rhythm and unresponsiveness to short-term refeeding. *Eur J Endocrinol*, **138**, 4, pp. 415-20.

Balthasar N., Coppari R., McMinn J., *et al.* (2004), Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron*, **42**, 6, pp. 983-91.

- Banks W. A., Tschop M., Robinson S. M., *et al.* (2002), Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther*, **302**, 2, pp. 822-7.
- Baratta M., Saleri R., Mainardi G. L., *et al.* (2002), Leptin regulates GH gene expression and secretion and nitric oxide production in pig pituitary cells. *Endocrinology*, **143**, 2, pp. 551-7.
- Barbarino A., Corsello S. M., Della Casa S., *et al.* (1990), Corticotropin-releasing hormone inhibition of growth hormone-releasing hormone-induced growth hormone release in man. *J Clin Endocrinol Metab*, **71**, 5, pp. 1368-74.
- Barinaga M., Bilezikjian L. M., Vale W. W., *et al.* (1985), Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature*, **314**, 6008, pp. 279-81.
- Barkan A. L., Dimaraki E. V., Jessup S. K., *et al.* (2003), Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**, 5, pp. 2180-4.
- Baskin D. G., Wilcox B. J., Figlewicz D. P., *et al.* (1988), Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci*, **11**, 3, pp. 107-11.
- Bataille D., Blache P., Mercier F., *et al.* (1988), Glucagon and related peptides. Molecular structure and biological specificity. *Ann N Y Acad Sci*, **527**, pp. 168-85.
- Batterham R. L., Cohen M. A., Ellis S. M., *et al.* (2003), Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med*, **349**, 10, pp. 941-8.
- Batterham R. L., Cowley M. A., Small C. J., *et al.* (2002), Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*, **418**, 6898, pp. 650-4.
- Baumann G. (1991), Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocr Rev*, **12**, 4, pp. 424-49.
- Baumann G., Stolar M. W., Amburn K., *et al.* (1986), A specific growth hormone-binding protein in human plasma: initial characterization. *J Clin Endocrinol Metab*, **62**, 1, pp. 134-41.
- Baumbach W. R., Horner D. L., Logan J. S. (1989), The growth hormone-binding protein in rat serum is an alternatively spliced form of the rat growth hormone receptor. *Genes Dev*, **3**, 8, pp. 1199-205.
- Beudet A., Greenspun D., Raelson J., *et al.* (1995), Patterns of expression of SSTR1 and SSTR2 somatostatin receptor subtypes in the hypothalamus of the adult rat: relationship to neuroendocrine function. *Neuroscience*, **65**, 2, pp. 551-61.
- Beaumont N. J., Skinner V. O., Tan T. M., *et al.* (2003), Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem*, **278**, 11, pp. 8877-80.

Beck B., Richey S., Stricker-Krongrad A. (2003), Ghrelin and body weight regulation in the obese Zucker rat in relation to feeding state and dark/light cycle. *Exp Biol Med (Maywood)*, **228**, 10, pp. 1124-31.

Bednarek M. A., Feighner S. D., Pong S. S., *et al.* (2000), Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem*, **43**, 23, pp. 4370-6.

Bengtsson B. A., Brummer R. J., Eden S., *et al.* (1989), Body composition in acromegaly: the effect of treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **31**, 4, pp. 481-90.

Bennett P. A., Thomas G. B., Howard A. D., *et al.* (1997), Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology*, **138**, 11, pp. 4552-7.

Benoit S. C., Air E. L., Coolen L. M., *et al.* (2002), The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci*, **22**, 20, pp. 9048-52.

Berelowitz M., Szabo M., Frohman L. A., *et al.* (1981), Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science*, **212**, 4500, pp. 1279-81.

Bertherat J., Timsit J., Bluet-Pajot M. T., *et al.* (1993), Chronic growth hormone (GH) hypersecretion induces reciprocal and reversible changes in mRNA levels from hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin neurons in the rat. *J Clin Invest*, **91**, 4, pp. 1783-91.

Bewick G. A., Gardiner J. V., Dhillon W. S., *et al.* (2005), Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *Faseb J*, **19**, 12, pp. 1680-2.

Billestrup N., Swanson L. W., Vale W. (1986), Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 18, pp. 6854-7.

Blache P., Kervran A., Bataille D. (1988), Oxyntomodulin and glicentin: brain-gut peptides in the rat. *Endocrinology*, **123**, 6, pp. 2782-7.

Bluet-Pajot M. T., Tolle V., Zizzari P., *et al.* (2005), [Ghrelin: a striking example of neuroendocrine peptide pleiotropy]. *Med Sci (Paris)*, **21**, 8-9, pp. 715-21.

Blum W. F., Albertsson-Wikland K., Rosberg S., *et al.* (1993), Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, **76**, 6, pp. 1610-6.

Bodart V., Bouchard J. F., McNicoll N., *et al.* (1999), Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ Res*, **85**, 9, pp. 796-802.

Bodart V., Febbraio M., Demers A., *et al.* (2002), CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res*, **90**, 8, pp. 844-9.

Bodner M., Karin M. (1987), A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. *Cell*, **50**, 2, pp. 267-75.

Boni-Schnetzler M., Gosteli-Peter M. A., Moritz W., *et al.* (1996), Reduced ob mRNA in hypophysectomised rats is not restored by growth hormone (GH), but further suppressed by exogenously administered insulin-like growth factor (IGF) I. *Biochem Biophys Res Commun*, **225**, 1, pp. 296-301.

Bowers C., Chang J., Momany F., *et al.* (1977). Effects of enkephalins and enkephalins analogs on release of pituitary hormones in vitro. Elsevier, Amsterdam/North Holland, 287-92 p. (Molecular Endocrinology).

Bowers C. Y., Momany F., Reynolds G. A., *et al.* (1980), Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology*, **106**, 3, pp. 663-7.

Bowers C. Y., Momany F. A., Reynolds G. A., *et al.* (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**, 5, pp. 1537-45.

Brandou F., Aloulou I., Razimbaud A., *et al.* (2006), Lower ability to oxidize lipids in adult patients with growth hormone (GH) deficiency: reversal under GH treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **65**, 4, pp. 423-8.

Bratusch-Marrain P., Waldhausl W. (1979), The influence of amino acids and somatostatin on prolactin and growth hormone release in man. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **90**, 3, pp. 403-8.

Brazeau P., Ling N., Bohlen P., *et al.* (1982), Growth hormone releasing factor, somatocrinin, releases pituitary growth hormone in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 24, pp. 7909-13.

Brazeau P., Vale W., Burgus R., *et al.* (1973), Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, **179**, 68, pp. 77-9.

Broberger C. (1999), Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res*, **848**, 1-2, pp. 101-13.

Broberger C., Johansen J., Johansson C., *et al.* (1998), The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 25, pp. 15043-8.

Broglio F., Arvat E., Benso A., *et al.* (2001), Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 10, pp. 5083-6.

Broglio F., Benso A., Castiglioni C., *et al.* (2003), The endocrine response to ghrelin as a function of gender in humans in young and elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**, 4, pp. 1537-42.

Bruni J. F., Van Vugt D., Marshall S., *et al.* (1977), Effects of naloxone, morphine and methionine enkephalin on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, thyroid stimulating hormone and growth hormone. *Life Sci*, **21**, 3, pp. 461-6.

Bugarith K., Dinh T. T., Li A. J., *et al.* (2005), Basomedial hypothalamic injections of neuropeptide Y conjugated to saporin selectively disrupt hypothalamic controls of food intake. *Endocrinology*, **146**, 3, pp. 1179-91.

Bulik C. M., Sullivan P. F., Wade T. D., *et al.* (2000), Twin studies of eating disorders: a review. *Int J Eat Disord*, **27**, 1, pp. 1-20.

Burton K. A., Kabigting E. B., Clifton D. K., *et al.* (1992), Growth hormone receptor messenger ribonucleic acid distribution in the adult male rat brain and its colocalization in hypothalamic somatostatin neurons. *Endocrinology*, **131**, 2, pp. 958-63.

Callahan H. S., Cummings D. E., Pepe M. S., *et al.* (2004), Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**, 3, pp. 1319-24.

Caminos J. E., Seoane L. M., Tovar S. A., *et al.* (2002), Influence of thyroid status and growth hormone deficiency on ghrelin. *Eur J Endocrinol*, **147**, 1, pp. 159-63.

Cao J. M., Ong H., Chen C. (2006), Effects of ghrelin and synthetic GH secretagogues on the cardiovascular system. *Trends Endocrinol Metab*, **17**, 1, pp. 13-8.

Carro E., Senaris R., Considine R. V., *et al.* (1997), Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology*, **138**, 5, pp. 2203-6.

Carro E., Senaris R. M., Seoane L. M., *et al.* (1999), Role of growth hormone (GH)-releasing hormone and somatostatin on leptin-induced GH secretion. *Neuroendocrinology*, **69**, 1, pp. 3-10.

Cassoni P., Papotti M., Ghe C., *et al.* (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**, 4, pp. 1738-45.

Challis B. G., Pinnock S. B., Coll A. P., *et al.* (2003), Acute effects of PYY3-36 on food intake and hypothalamic neuropeptide expression in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, **311**, 4, pp. 915-9.

Chan C. B., Cheng C. H. (2004), Identification and functional characterization of two alternatively spliced growth hormone secretagogue receptor transcripts from the pituitary of black seabream *Acanthopagrus schlegeli*. *Mol Cell Endocrinol*, **214**, 1-2, pp. 81-95.

Chan Y. Y., Steiner R. A., Clifton D. K. (1996), Regulation of hypothalamic neuropeptide-Y neurons by growth hormone in the rat. *Endocrinology*, **137**, 4, pp. 1319-25.

Charlton H. M., Clark R. G., Robinson I. C., *et al.* (1988), Growth hormone-deficient dwarfism in the rat: a new mutation. *J Endocrinol*, **119**, 1, pp. 51-8.

Chen C. Y., Chao Y., Chang F. Y., *et al.* (2005), Intracisternal des-acyl ghrelin inhibits food intake and non-nutrient gastric emptying in conscious rats. *Int J Mol Med*, **16**, 4, pp. 695-9.

Chen H., Charlat O., Tartaglia L. A., *et al.* (1996), Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, **84**, 3, pp. 491-5.

Cheng K., Chan W. W., Barreto A., Jr., *et al.* (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**, 6, pp. 2791-8.

Cheng K., Chan W. W., Butler B., *et al.* (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**, 6, pp. 3337-42.

Cheung C. C., Clifton D. K., Steiner R. A. (1997), Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology*, **138**, 10, pp. 4489-92.

Chihara K., Minamitani N., Kaji H., *et al.* (1981), Intraventricularly injected growth hormone stimulates somatostatin release into rat hypophysial portal blood. *Endocrinology*, **109**, 6, pp. 2279-81.

Chlouverakis C., White P. A. (1969), Obesity and insulin resistance in the obese-hyperglycemic mouse (obob). *Metabolism*, **18**, 12, pp. 998-1006.

Choi K., Roh S. G., Hong Y. H., *et al.* (2003), The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology*, **144**, 3, pp. 754-9.

Chomczynski P., Downs T. R., Frohman L. A. (1988), Feedback regulation of growth hormone (GH)-releasing hormone gene expression by GH in rat hypothalamus. *Mol Endocrinol*, **2**, 3, pp. 236-41.

Chua S. C., Jr., Leibel R. L., Hirsch J. (1991), Food deprivation and age modulate neuropeptide gene expression in the murine hypothalamus and adrenal gland. *Brain Res Mol Brain Res*, **9**, 1-2, pp. 95-101.

Ciriello J., McMurray J. C., Babic T., *et al.* (2003), Collateral axonal projections from hypothalamic hypocretin neurons to cardiovascular sites in nucleus ambiguus and nucleus tractus solitarius. *Brain Res*, **991**, 1-2, pp. 133-41.

Clark R. G., Carlsson L. M., Robinson I. C. (1987), Growth hormone secretory profiles in conscious female rats. *J Endocrinol*, **114**, 3, pp. 399-407.

Clark R. G., Carlsson L. M., Robinson I. C. (1988), Growth hormone (GH) secretion in the conscious rat: negative feedback of GH on its own release. *J Endocrinol*, **119**, 2, pp. 201-9.

Clark R. G., Robinson I. C. (1985), Growth induced by pulsatile infusion of an amidated fragment of human growth hormone releasing factor in normal and GHRF-deficient rats. *Nature*, **314**, 6008, pp. 281-3.

Clarke I., Jessop D., Millar R., *et al.* (1993), Many peptides that are present in the external zone of the median eminence are not secreted into the hypophysial portal blood of sheep. *Neuroendocrinology*, **57**, 5, pp. 765-75.

Clement K., Vaisse C., Lahlou N., *et al.* (1998), A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*, **392**, 6674, pp. 398-401.

Coiro V., Saccani-Jotti G., Minelli R., *et al.* (2005), Adrenocorticotropin/cortisol and arginine-vasopressin secretory patterns in response to ghrelin in normal men. *Neuroendocrinology*, **81**, 2, pp. 103-6.

Coiro V., Volpi R., Capretti L., *et al.* (1992), Intravenously infused substance P enhances basal and growth hormone (GH) releasing hormone-stimulated GH secretion in normal men. *Peptides*, **13**, 4, pp. 843-6.

Coleman D. L. (1973), Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*, **9**, 4, pp. 294-8.

Copeland K. C., Colletti R. B., Devlin J. T., *et al.* (1990), The relationship between insulin-like growth factor-I, adiposity, and aging. *Metabolism*, **39**, 6, pp. 584-7.

Cota D., Proulx K., Smith K. A., *et al.* (2006), Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*, **312**, 5775, pp. 927-30.

Cowley M. A., Smith R. G., Diano S., *et al.* (2003), The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, **37**, 4, pp. 649-61.

Critchlow V., Abe K., Urman S., *et al.* (1981), Effect of lesions in the periventricular nucleus of the preoptic-anterior hypothalamus on growth hormone and thyrotropin secretion and brain somatostatin. *Brain Res*, **222**, 2, pp. 267-76.

Critchlow V., Rice R. W., Abe K., *et al.* (1978), Somatostatin content of the median eminence in female rats with lesion-induced disruption of the inhibitory control of growth hormone secretion. *Endocrinology*, **103**, 3, pp. 817-25.

Cummings D. E., Purnell J. Q., Frayo R. S., *et al.* (2001), A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, **50**, 8, pp. 1714-9.

Cummings D. E., Weigle D. S., Frayo R. S., *et al.* (2002), Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med*, **346**, 21, pp. 1623-30.

Cunningham B. C., Ultsch M., De Vos A. M., *et al.* (1991), Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science*, **254**, 5033, pp. 821-5.

- Currie P. J., Coscina D. V. (1995), Dissociated feeding and hypothermic effects of neuropeptide Y in the paraventricular and perifornical hypothalamus. *Peptides*, **16**, 4, pp. 599-604.
- D'Alessio D. A., Kieffer T. J., Taborsky G. J., Jr., *et al.* (2001), Activation of the parasympathetic nervous system is necessary for normal meal-induced insulin secretion in rhesus macaques. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 3, pp. 1253-9.
- D'Ercole A. J., Ye P., O'Kusky J. R. (2002), Mutant mouse models of insulin-like growth factor actions in the central nervous system. *Neuropeptides*, **36**, 2-3, pp. 209-20.
- Daikoku S., Hisano S., Kawano H., *et al.* (1988), Ultrastructural evidence for neuronal regulation of growth hormone secretion. *Neuroendocrinology*, **47**, 5, pp. 405-15.
- Danger J. M., Tonon M. C., Jenks B. G., *et al.* (1990), Neuropeptide Y: localization in the central nervous system and neuroendocrine functions. *Fundam Clin Pharmacol*, **4**, 3, pp. 307-40.
- Danguir J., Nicolaidis S. (1984), Chronic intracerebroventricular infusion of insulin causes selective increase of slow wave sleep in rats. *Brain Res*, **306**, 1-2, pp. 97-103.
- Daniels A. J., Grizzle M. K., Wiard R. P., *et al.* (2002), Food intake inhibition and reduction in body weight gain in lean and obese rodents treated with GW438014A, a potent and selective NPY-Y5 receptor antagonist. *Regul Pept*, **106**, 1-3, pp. 47-54.
- Date Y., Kojima M., Hosoda H., *et al.* (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**, 11, pp. 4255-61.
- Date Y., Murakami N., Kojima M., *et al.* (2000), Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **275**, 2, pp. 477-80.
- Date Y., Murakami N., Toshinai K., *et al.* (2002), The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*, **123**, 4, pp. 1120-8.
- Date Y., Nakazato M., Murakami N., *et al.* (2001), Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun*, **280**, 3, pp. 904-7.
- Davies L., Marks J. L. (1994), Role of hypothalamic neuropeptide Y gene expression in body weight regulation. *Am J Physiol*, **266**, 5 Pt 2, pp. R1687-91.
- De Boer H., Blok G. J., Voerman H. J., *et al.* (1992), Body composition in adult growth hormone-deficient men, assessed by anthropometry and bioimpedance analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, **75**, 3, pp. 833-7.
- De Gennaro Colonna V., Cella S. G., Parenti M., *et al.* (1994), Neuroendocrine aging: its impact on somatotrophic function. *Neurochem Int*, **25**, 1, pp. 5-10.

De Gobbi M., Viprakasit V., Hughes J. R., *et al.* (2006), A regulatory SNP causes a human genetic disease by creating a new transcriptional promoter. *Science*, **312**, 5777, pp. 1215-7.

de Lecea L., Criado J. R., Prospero-Garcia O., *et al.* (1996), A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature*, **381**, 6579, pp. 242-5.

de Rijke C. E., Jackson P. J., Garner K. M., *et al.* (2005), Functional analysis of the Ala67Thr polymorphism in agouti related protein associated with anorexia nervosa and leanness. *Biochem Pharmacol*, **70**, 2, pp. 308-16.

De Vriese C., Gregoire F., Lema-Kisoka R., *et al.* (2004), Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology*, **145**, 11, pp. 4997-5005.

Deghenghi R., Papotti M., Ghigo E., *et al.* (2001), Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J Endocrinol Invest*, **24**, 1, pp. RC1-3.

Delehaye-Zervas M. C., Mertani H., Martini J. F., *et al.* (1994), Expression of the growth hormone receptor gene in human digestive tissue. *J Clin Endocrinol Metab*, **78**, 6, pp. 1473-80.

Della-Zuana O., Presse F., Ortola C., *et al.* (2002), Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **26**, 10, pp. 1289-95.

DeNoto F. M., Moore D. D., Goodman H. M. (1981), Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res*, **9**, 15, pp. 3719-30.

Deslauriers N., Gaudreau P., Abribat T., *et al.* (1991), Dynamics of growth hormone responsiveness to growth hormone releasing factor in aging rats: peripheral and central influences. *Neuroendocrinology*, **53**, 5, pp. 439-46.

Di Luigi L., Conti F. G., Casini A., *et al.* (1997), Growth hormone and insulin-like growth factor I responses to moderate submaximal acute physical exercise in man: effects of octreotide, a somatostatin analogue, administration. *Int J Sports Med*, **18**, 4, pp. 257-63.

Dickson S. L., Doutrelant-Viltart O., Dyball R. E., *et al.* (1996), Retrogradely labelled neurosecretory neurones of the rat hypothalamic arcuate nucleus express Fos protein following systemic injection of GH-releasing peptide-6. *J Endocrinol*, **151**, 2, pp. 323-31.

Dornonville de la Cour C., Bjorkqvist M., Sandvik A. K., *et al.* (2001), A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept*, **99**, 2-3, pp. 141-50.

Dornonville de la Cour C., Lindqvist A., Egecioglu E., *et al.* (2005), Ghrelin treatment reverses the reduction in weight gain and body fat in gastrectomised mice. *Gut*, **54**, 7, pp. 907-13.

Douglass J., Daoud S. (1996), Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript. *Gene*, **169**, 2, pp. 241-5.

Draznin B., Dahl R., Sherman N., *et al.* (1988), Exocytosis in normal anterior pituitary cells. Quantitative correlation between growth hormone release and the morphological features of exocytosis. *J Clin Invest*, **81**, 4, pp. 1042-50.

Drouva S. V., Epelbaum J., Tapia-Arancibia L., *et al.* (1981), Opiate receptors modulate LHRH and SRIF release from mediobasal hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology*, **32**, 3, pp. 163-7.

Dun S. L., Brailoiu G. C., Brailoiu E., *et al.* (2006), Distribution and biological activity of obestatin in the rat. *J Endocrinol*, **191**, 2, pp. 481-9.

Eckstein N., Wehrenberg W. B., Louis K., *et al.* (1980), Effects of substance P on anterior pituitary secretion in the female rhesus monkey. *Neuroendocrinology*, **31**, 5, pp. 338-42.

Eden Engstrom B., Burman P., Holdstock C., *et al.* (2003), Effects of growth hormone (GH) on ghrelin, leptin, and adiponectin in GH-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**, 11, pp. 5193-8.

Eden S. (1979), Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, **105**, 2, pp. 555-60.

Edens A., Southard J. N., Talamantes F. (1994), Mouse growth hormone-binding protein and growth hormone receptor transcripts are produced from a single gene by alternative splicing. *Endocrinology*, **135**, 6, pp. 2802-5.

Egido E. M., Rodriguez-Gallardo J., Silvestre R. A., *et al.* (2002), Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *Eur J Endocrinol*, **146**, 2, pp. 241-4.

Elias C. F., Lee C., Kelly J., *et al.* (1998), Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, **21**, 6, pp. 1375-85.

Enjalbert A., Tapia-Arancibia L., Rieutort M., *et al.* (1982), Somatostatin receptors on rat anterior pituitary membranes. *Endocrinology*, **110**, 5, pp. 1634-40.

Epelbaum J. (1986), Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol*, **27**, 1, pp. 63-100.

Epelbaum J., Tapia Arancibia L., Kordon C., *et al.* (1982), Characterization, regional distribution, and subcellular distribution of ¹²⁵I-Tyr¹-somatostatin binding sites in rat brain. *J Neurochem*, **38**, 6, pp. 1515-23.

Erickson J. C., Clegg K. E., Palmiter R. D. (1996), Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature*, **381**, 6581, pp. 415-21.

Evans H. M., Long J. A. (1921), Characteristic effects on growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. *Anat. record*, **21**, pp. 61.

Farhy L. S., Straume M., Johnson M. L., *et al.* (2002), Unequal autonegative feedback by GH models the sexual dimorphism in GH secretory dynamics. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **282**, 3, pp. R753-64.

Fazekas I., Bacsy E., Varga I., *et al.* (2000), Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on growth hormone (GH) and prolactin (PRL) release and cell morphology in human pituitary adenoma cell cultures. *Folia Histochem Cytobiol*, **38**, 3, pp. 119-27.

Feighner S. D., Howard A. D., Prendergast K., *et al.* (1998), Structural requirements for the activation of the human growth hormone secretagogue receptor by peptide and nonpeptide secretagogues. *Mol Endocrinol*, **12**, 1, pp. 137-45.

Fichter M. M., Quadflieg N. (1999), Six-year course and outcome of anorexia nervosa. *Int J Eat Disord*, **26**, 4, pp. 359-85.

Florini J. R., Ewton D. Z., Coolican S. A. (1996), Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev*, **17**, 5, pp. 481-517.

Fodor M., Csaba Z., Kordon C., *et al.* (1994), Growth hormone-releasing hormone, somatostatin, galanin and beta-endorphin afferents to the hypothalamic periventricular nucleus. *J Chem Neuroanat*, **8**, 1, pp. 61-73.

Frasier S. D., Aceto T., Jr., Hayles A. B. (1978), Collaborative study of the effects of human growth hormone in growth hormone deficiency. V. Treatment with growth hormone administered once a week. *J Clin Endocrinol Metab*, **47**, 3, pp. 686-8.

Freda P. U., Reyes C. M., Conwell I. M., *et al.* (2003), Serum ghrelin levels in acromegaly: effects of surgical and long-acting octreotide therapy. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**, 5, pp. 2037-44.

Frieboes R. M., Murck H., Antonijevic I. A., *et al.* (1999), Effects of growth hormone-releasing peptide-6 on the nocturnal secretion of GH, ACTH and cortisol and on the sleep EEG in man: role of routes of administration. *J Neuroendocrinol*, **11**, 6, pp. 473-8.

Frohman L. A., Downs T. R., Clarke I. J., *et al.* (1990), Measurement of growth hormone-releasing hormone and somatostatin in hypothalamic-portal plasma of unanesthetized sheep. Spontaneous secretion and response to insulin-induced hypoglycemia. *J Clin Invest*, **86**, 1, pp. 17-24.

Furuse M., Tachibana T., Ohgushi A., *et al.* (2001), Intracerebroventricular injection of ghrelin and growth hormone releasing factor inhibits food intake in neonatal chicks. *Neurosci Lett*, **301**, 2, pp. 123-6.

Gabriel S. M., Roncancio J. R., Ruiz N. S. (1992), Growth hormone pulsatility and the endocrine milieu during sexual maturation in male and female rats. *Neuroendocrinology*, **56**, 5, pp. 619-25.

- Gause I., Isaksson O., Lindahl A., *et al.* (1985), Effect of insulin treatment of hypophysectomized rats on adipose tissue responsiveness to insulin and growth hormone. *Endocrinology*, **116**, 3, pp. 945-51.
- Gaylinn B. D., Harrison J. K., Zysk J. R., *et al.* (1993), Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol*, **7**, 1, pp. 77-84.
- Geelissen S. M., Swennen Q., Geyten S. V., *et al.* (2006), Peripheral ghrelin reduces food intake and respiratory quotient in chicken. *Domest Anim Endocrinol*, **30**, 2, pp. 108-16.
- Ghelardoni S., Carnicelli V., Frascarelli S., *et al.* (2006), Ghrelin tissue distribution: comparison between gene and protein expression. *J Endocrinol Invest*, **29**, 2, pp. 115-21.
- Giavoli C., Cappiello V., Corbetta S., *et al.* (2004), Different effects of short- and long-term recombinant hGH administration on ghrelin and adiponectin levels in GH-deficient adults. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **61**, 1, pp. 81-7.
- Glatt C. E., Wahner A. D., White D. J., *et al.* (2006), Gain-of-function haplotypes in the vesicular monoamine transporter promoter are protective for Parkinson disease in women. *Hum Mol Genet*, **15**, 2, pp. 299-305.
- Gomez S., Morel A., Nicolas P., *et al.* (1983), Regional distribution of the Mr 15,000 somatostatin precursor, somatostatin-28 and somatostatin-14 in the rat brain suggests a differential intracellular processing of the high molecular weight species. *Biochem Biophys Res Commun*, **112**, 1, pp. 297-305.
- Goodman R. H., Aron D. C., Roos B. A. (1983), Rat pre-prosomatostatin. Structure and processing by microsomal membranes. *J Biol Chem*, **258**, 9, pp. 5570-3.
- Gotestam K. G., Eriksen L., Hagen H. (1995), An epidemiological study of eating disorders in Norwegian psychiatric institutions. *Int J Eat Disord*, **18**, 3, pp. 263-8.
- Goth M. I., Lyons C. E., Canny B. J., *et al.* (1992), Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, growth hormone (GH)-releasing peptide and GH-releasing hormone stimulate GH release through distinct pituitary receptors. *Endocrinology*, **130**, 2, pp. 939-44.
- Graham M., Shutter J. R., Sarmiento U., *et al.* (1997), Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet*, **17**, 3, pp. 273-4.
- Greenhalgh C. J., Alexander W. S. (2004), Suppressors of cytokine signalling and regulation of growth hormone action. *Growth Horm IGF Res*, **14**, 3, pp. 200-6.
- Grill H. J., Schwartz M. W., Kaplan J. M., *et al.* (2002), Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology*, **143**, 1, pp. 239-46.
- Groschl M., Uhr M., Kraus T. (2004), Evaluation of the comparability of commercial ghrelin assays. *Clin Chem*, **50**, 2, pp. 457-8.

Guan X. M., Yu H., Palyha O. C., *et al.* (1997), Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res*, **48**, 1, pp. 23-9.

Guillemin R., Brazeau P., Bohlen P., *et al.* (1982), Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science*, **218**, 4572, pp. 585-7.

Hahn T. M., Breininger J. F., Baskin D. G., *et al.* (1998), Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci*, **1**, 4, pp. 271-2.

Halatchev I. G., Ellacott K. L., Fan W., *et al.* (2004), Peptide YY3-36 inhibits food intake in mice through a melanocortin-4 receptor-independent mechanism. *Endocrinology*, **145**, 6, pp. 2585-90.

Harel Z., Tannenbaum G. S. (1992), Synergistic interaction between insulin-like growth factors-I and -II in central regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology*, **131**, 2, pp. 758-64.

Harrold J. A., Widdowson P. S., Williams G. (1999), Altered energy balance causes selective changes in melanocortin-4(MC4-R), but not melanocortin-3 (MC3-R), receptors in specific hypothalamic regions: further evidence that activation of MC4-R is a physiological inhibitor of feeding. *Diabetes*, **48**, 2, pp. 267-71.

Hashimoto K., Koizumi H., Nakazato M., *et al.* (2005), Role of brain-derived neurotrophic factor in eating disorders: recent findings and its pathophysiological implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **29**, 4, pp. 499-504.

Haynes A. C., Jackson B., Chapman H., *et al.* (2000), A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul Pept*, **96**, 1-2, pp. 45-51.

Hebebrand J., Remschmidt H. (1995), Anorexia nervosa viewed as an extreme weight condition: genetic implications. *Hum Genet*, **95**, 1, pp. 1-11.

Heinrichs S. C., Richard D. (1999), The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides*, **33**, 5, pp. 350-9.

Helboe L., Stidsen C. E., Moller M. (1998), Immunohistochemical and cytochemical localization of the somatostatin receptor subtype sst1 in the somatostatinergic parvocellular neuronal system of the rat hypothalamus. *J Neurosci*, **18**, 13, pp. 4938-45.

Herpertz S., Albers N., Wagner R., *et al.* (2000), Longitudinal changes of circadian leptin, insulin and cortisol plasma levels and their correlation during refeeding in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*, **142**, 4, pp. 373-9.

Herrington J., Hille B. (1994), Growth hormone-releasing hexapeptide elevates intracellular calcium in rat somatotropes by two mechanisms. *Endocrinology*, **135**, 3, pp. 1100-8.

Hervey G. R. (1959), The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol*, **145**, 2, pp. 336-52.

Hisano S., Daikoku S. (1991), Existence of mutual synaptic relations between corticotropin-releasing factor-containing and somatostatin-containing neurons in the rat hypothalamus. *Brain Res*, **545**, 1-2, pp. 265-75.

Hisano S., Tsuruo Y., Kagotani Y., *et al.* (1990), Immunohistochemical evidence for synaptic connections between neuropeptide Y-containing axons and periventricular somatostatin neurons in the anterior hypothalamus in rats. *Brain Res*, **520**, 1-2, pp. 170-7.

Holst B., Cygankiewicz A., Jensen T. H., *et al.* (2003), High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol*, **17**, 11, pp. 2201-10.

Holst B., Egerod K. L., Schild E., *et al.* (2006), GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology*, pp.

Holst B., Lang M., Brandt E., *et al.* (2006), Ghrelin receptor inverse agonists: identification of an active peptide core and its interaction epitopes on the receptor. *Mol Pharmacol*, **70**, 3, pp. 936-46.

Horvath S., Palkovits M. (1988), Synaptic interconnections among growth hormone-releasing hormone (GHRH)-containing neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, **48**, 5, pp. 471-6.

Hosoda H., Doi K., Nagaya N., *et al.* (2004), Optimum collection and storage conditions for ghrelin measurements: octanoyl modification of ghrelin is rapidly hydrolyzed to desacyl ghrelin in blood samples. *Clin Chem*, **50**, 6, pp. 1077-80.

Hosoda H., Kojima M., Matsuo H., *et al.* (2000), Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, **279**, 3, pp. 909-13.

Hosoda H., Kojima M., Matsuo H., *et al.* (2000), Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem*, **275**, 29, pp. 21995-2000.

Hosoda H., Kojima M., Mizushima T., *et al.* (2003), Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem*, **278**, 1, pp. 64-70.

Howard A. D., Feighner S. D., Cully D. F., *et al.* (1996), A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, **273**, 5277, pp. 974-7.

Hu Z., Cha S. H., van Haasteren G., *et al.* (2005), Effect of centrally administered C75, a fatty acid synthase inhibitor, on ghrelin secretion and its downstream effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11, pp. 3972-7.

Hulting A. L., Meister B., Carlsson L., *et al.* (1991), On the role of the peptide galanin in regulation of growth hormone secretion. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **125**, 5, pp. 518-25.

- Huszar D., Lynch C. A., Fairchild-Huntress V., *et al.* (1997), Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, **88**, 1, pp. 131-41.
- Hwang B. H., Guntz J. M. (1997), Downregulation of corticotropin-releasing factor mRNA, but not vasopressin mRNA, in the paraventricular hypothalamic nucleus of rats following nutritional stress. *Brain Res Bull*, **43**, 5, pp. 509-14.
- Isaksson O. G., Lindahl A., Nilsson A., *et al.* (1987), Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocr Rev*, **8**, 4, pp. 426-38.
- Isgaard J., Carlsson L., Isaksson O. G., *et al.* (1988), Pulsatile intravenous growth hormone (GH) infusion to hypophysectomized rats increases insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid in skeletal tissues more effectively than continuous GH infusion. *Endocrinology*, **123**, 6, pp. 2605-10.
- Ishikawa K., Taniguchi Y., Kurosumi K., *et al.* (1987), Immunohistochemical identification of somatostatin-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Endocrinology*, **121**, 1, pp. 94-7.
- Ishikawa M., Hiroi N., Kamioka T., *et al.* (2001), Metabolic effects of 20 kDa and 22 kDa human growth hormones on adult male spontaneous dwarf rats. *Eur J Endocrinol*, **145**, 6, pp. 791-7.
- Jacks T., Hickey G., Judith F., *et al.* (1994), Effects of acute and repeated intravenous administration of L-692,585, a novel non-peptidyl growth hormone secretagogue, on plasma growth hormone, IGF-1, ACTH, cortisol, prolactin, insulin, and thyroxine levels in beagles. *J Endocrinol*, **143**, 2, pp. 399-406.
- Jackson V. R., Nothacker H. P., Civelli O. (2006), GPR39 receptor expression in the mouse brain. *Neuroreport*, **17**, 8, pp. 813-6.
- Jacobowitz D. M., Schulte H., Chrousos G. P., *et al.* (1983), Localization of GRF-like immunoreactive neurons in the rat brain. *Peptides*, **4**, 4, pp. 521-4.
- Jaffe C. A., Ocampo-Lim B., Guo W., *et al.* (1998), Regulatory mechanisms of growth hormone secretion are sexually dimorphic. *J Clin Invest*, **102**, 1, pp. 153-64.
- Janssen J. A., van der Toorn F. M., Hofland L. J., *et al.* (2001), Systemic ghrelin levels in subjects with growth hormone deficiency are not modified by one year of growth hormone replacement therapy. *Eur J Endocrinol*, **145**, 6, pp. 711-6.
- Jarkovska Z., Rosicka M., Marek J., *et al.* (2006), Plasma levels of total and active ghrelin in acromegaly and growth hormone deficiency. *Physiol Res*, **55**, 2, pp. 175-81.
- Jeffery P. L., Herington A. C., Chopin L. K. (2002), Expression and action of the growth hormone releasing peptide ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines. *J Endocrinol*, **172**, 3, pp. R7-11.

Johansen T., Richelsen B., Hansen H. S., *et al.* (2003), Growth hormone-mediated breakdown of body fat: effects of GH on lipases in adipose tissue and skeletal muscle of old rats fed different diets. *Horm Metab Res*, **35**, 4, pp. 243-50.

Kamegai J., Minami S., Sugihara H., *et al.* (1996), Growth hormone receptor gene is expressed in neuropeptide Y neurons in hypothalamic arcuate nucleus of rats. *Endocrinology*, **137**, 5, pp. 2109-12.

Kamegai J., Minami S., Sugihara H., *et al.* (1994), Growth hormone induces expression of the c-fos gene on hypothalamic neuropeptide-Y and somatostatin neurons in hypophysectomized rats. *Endocrinology*, **135**, 6, pp. 2765-71.

Kamegai J., Tamura H., Shimizu T., *et al.* (2001), Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*, **50**, 11, pp. 2438-43.

Kamel A., Norgren S., Elimam A., *et al.* (2000), Effects of growth hormone treatment in obese prepubertal boys. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 4, pp. 1412-9.

Kanatani A., Ito J., Ishihara A., *et al.* (1998), NPY-induced feeding involves the action of a Y1-like receptor in rodents. *Regul Pept*, **75-76**, pp. 409-15.

Kapas L., Obal F., Jr., Alfoldi P., *et al.* (1988), Effects of nocturnal intraperitoneal administration of cholecystokinin in rats: simultaneous increase in sleep, increase in EEG slow-wave activity, reduction of motor activity, suppression of eating, and decrease in brain temperature. *Brain Res*, **438**, 1-2, pp. 155-64.

Kasanuki J., Makino H., Matsushima Y., *et al.* (1981), Effect of hypophysectomy and growth hormone administration on somatostatin and gastrin content in the stomach of rats. *Endocrinol Jpn*, **28**, 3, pp. 257-60.

Kastin A. J., Pan W., Maness L. M., *et al.* (1999), Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor. *Peptides*, **20**, 12, pp. 1449-53.

Katakami H., Arimura A., Frohman L. A. (1985), Involvement of hypothalamic somatostatin in the suppression of growth hormone secretion by central corticotropin-releasing factor in conscious male rats. *Neuroendocrinology*, **41**, 5, pp. 390-3.

Katakami H., Arimura A., Frohman L. A. (1986), Growth hormone (GH)-releasing factor stimulates hypothalamic somatostatin release: an inhibitory feedback effect on GH secretion. *Endocrinology*, **118**, 5, pp. 1872-7.

Katakami H., Downs T. R., Frohman L. A. (1988), Inhibitory effect of hypothalamic medial preoptic area somatostatin on growth hormone-releasing factor in the rat. *Endocrinology*, **123**, 2, pp. 1103-9.

Kenakin T. (2001), Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *Faseb J*, **15**, 3, pp. 598-611.

- Kim E. K., Miller I., Landree L. E., *et al.* (2002), Expression of FAS within hypothalamic neurons: a model for decreased food intake after C75 treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **283**, 5, pp. E867-79.
- Kipman A., Gorwood P., Mouren-Simeoni M. C., *et al.* (1999), Genetic factors in anorexia nervosa. *Eur Psychiatry*, **14**, 4, pp. 189-98.
- Kiyama H., Emson P. C. (1990), Distribution of somatostatin mRNA in the rat nervous system as visualized by a novel non-radioactive in situ hybridization histochemistry procedure. *Neuroscience*, **38**, 1, pp. 223-44.
- Kojima M., Hosoda H., Date Y., *et al.* (1999), Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, **402**, 6762, pp. 656-60.
- Kokkotou E., Jeon J. Y., Wang X., *et al.* (2005), Mice with MCH ablation resist diet-induced obesity through strain-specific mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **289**, 1, pp. R117-24.
- Korbonits M., Jacobs R. A., Aylwin S. J., *et al.* (1998), Expression of the growth hormone secretagogue receptor in pituitary adenomas and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 10, pp. 3624-30.
- Kraicer J., Cowan J. S., Sheppard M. S., *et al.* (1986), Effect of somatostatin withdrawal and growth hormone (GH)-releasing factor on GH release in vitro: amount available for release after disinhibition. *Endocrinology*, **119**, 5, pp. 2047-51.
- Kreienkamp H. J., Akgun E., Baumeister H., *et al.* (1999), Somatostatin receptor subtype 1 modulates basal inhibition of growth hormone release in somatotrophs. *FEBS Lett*, **462**, 3, pp. 464-6.
- Kristensen P., Judge M. E., Thim L., *et al.* (1998), Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, **393**, 6680, pp. 72-6.
- Krude H., Biebermann H., Luck W., *et al.* (1998), Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet*, **19**, 2, pp. 155-7.
- Krulich L., Dhariwal A. P., McCann S. M. (1968), Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology*, **83**, 4, pp. 783-90.
- Lambert P. D., Couceyro P. R., McGirr K. M., *et al.* (1998), CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse*, **29**, 4, pp. 293-8.
- Lanneau C., Bluet-Pajot M. T., Zizzari P., *et al.* (2000), Involvement of the Sst1 somatostatin receptor subtype in the intrahypothalamic neuronal network regulating growth hormone secretion: an in vitro and in vivo antisense study. *Endocrinology*, **141**, 3, pp. 967-79.

- Lanzi R., Tannenbaum G. S. (1992), Time-dependent reduction and potentiation of growth hormone (GH) responsiveness to GH-releasing factor induced by exogenous GH: role for somatostatin. *Endocrinology*, **130**, 4, pp. 1822-8.
- Larhammar D. (1996), Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul Pept*, **65**, 3, pp. 165-74.
- Larsen P. J., Vrang N., Tang-Christensen M. (2003), Central pre-proglucagon derived peptides: opportunities for treatment of obesity. *Curr Pharm Des*, **9**, 17, pp. 1373-82.
- Larson B. A., Sinha Y. N., Vanderlaan W. P. (1976), Serum growth hormone and prolactin during and after the development of the obese-hyperglycemic syndrome in mice. *Endocrinology*, **98**, 1, pp. 139-45.
- Lauwers E., Landuyt B., Arckens L., *et al.* (2006), Obestatin does not activate orphan G protein-coupled receptor GPR39. *Biochem Biophys Res Commun*, **351**, 1, pp. 21-5.
- Lawrence C. B., Snape A. C., Baudoin F. M., *et al.* (2002), Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology*, **143**, 1, pp. 155-62.
- Leonetti F., Silecchia G., Iacobellis G., *et al.* (2003), Different plasma ghrelin levels after laparoscopic gastric bypass and adjustable gastric banding in morbid obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**, 9, pp. 4227-31.
- Leung D. W., Spencer S. A., Cachianes G., *et al.* (1987), Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature*, **330**, 6148, pp. 537-43.
- Levine A. S., Morley J. E. (1984), Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides*, **5**, 6, pp. 1025-9.
- Lewis U. J., Bonewald L. F., Lewis L. J. (1980), The 20,000-dalton variant of human growth hormone: location of the amino acid deletions. *Biochem Biophys Res Commun*, **92**, 2, pp. 511-6.
- Li C. H., Evans H. M. (1944), Isolation of pituitary hormone. *Science*, **99**, pp. 183.
- Li Y., Zhang D., Jin W., *et al.* (2006), Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism contributes to the variation in efficacy of sublingual nitroglycerin. *J Clin Invest*, **116**, 2, pp. 506-11.
- Lin C., Lin S. C., Chang C. P., *et al.* (1992), Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature*, **360**, 6406, pp. 765-8.
- Lin H. C., Taylor I. L. (2004), Release of peptide YY by fat in the proximal but not distal gut depends on an atropine-sensitive cholinergic pathway. *Regul Pept*, **117**, 1, pp. 73-6.
- Liposits Z., Merchenthaler I., Paull W. K., *et al.* (1988), Synaptic communication between somatostatinergic axons and growth hormone-releasing factor (GRF) synthesizing neurons in the arcuate nucleus of the rat. *Histochemistry*, **89**, 3, pp. 247-52.

Liposits Z., Merchenthaler I., Reid J. J., *et al.* (1993), Galanin-immunoreactive axons innervate somatostatin-synthesizing neurons in the anterior periventricular nucleus of the rat. *Endocrinology*, **132**, 2, pp. 917-23.

Lobie P. E., Breipohl W., Waters M. J. (1990), Growth hormone receptor expression in the rat gastrointestinal tract. *Endocrinology*, **126**, 1, pp. 299-306.

Lobie P. E., Garcia-Aragon J., Lincoln D. T., *et al.* (1993), Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*, **74**, 2, pp. 225-33.

Locatelli V., Rossoni G., Schweiger F., *et al.* (1999), Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology*, **140**, 9, pp. 4024-31.

Locke W., Kirgis H. D., Bowers C. Y., *et al.* (1995), Intracerebroventricular growth-hormone-releasing peptide-6 stimulates eating without affecting plasma growth hormone responses in rats. *Life Sci*, **56**, 16, pp. 1347-52.

Lumpkin M. D., Gegro-Vilar A., McCann S. M. (1981), Paradoxical elevation of growth hormone by intraventricular somatostatin: possible ultrashort-loop feedback. *Science*, **211**, 4486, pp. 1072-4.

MacGregor D. J., Leng G. (2005), Modelling the hypothalamic control of growth hormone secretion. *J Neuroendocrinol*, **17**, 12, pp. 788-803.

Maiter D., Underwood L. E., Maes M., *et al.* (1988), Different effects of intermittent and continuous growth hormone (GH) administration on serum somatomedin-C/insulin-like growth factor I and liver GH receptors in hypophysectomized rats. *Endocrinology*, **123**, 2, pp. 1053-9.

Maiter D., Underwood L. E., Martin J. B., *et al.* (1991), Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. *Endocrinology*, **128**, 2, pp. 1100-6.

Malik I. A., English P. J., Ghatei M. A., *et al.* (2004), The relationship of ghrelin to biochemical and anthropometric markers of adult growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **60**, 1, pp. 137-41.

Mandarino L., Stenner D., Blanchard W., *et al.* (1981), Selective effects of somatostatin-14, -25 and -28 on in vitro insulin and glucagon secretion. *Nature*, **291**, 5810, pp. 76-7.

Mannor D. A., Winer L. M., Shaw M. A., *et al.* (1991), Plasma growth hormone (GH)-binding proteins: effect on GH binding to receptors and GH action. *J Clin Endocrinol Metab*, **73**, 1, pp. 30-4.

Marsh D. J., Hollopeter G., Kafer K. E., *et al.* (1998), Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Nat Med*, **4**, 6, pp. 718-21.

- Martini J. F., Pezet A., Guezenec C. Y., *et al.* (1997), Monkey growth hormone (GH) receptor gene expression. Evidence for two mechanisms for the generation of the GH binding protein. *J Biol Chem*, **272**, 30, pp. 18951-8.
- Masuda A., Shibasaki T., Hotta M., *et al.* (1990), Insulin-induced hypoglycemia, L-dopa and arginine stimulate GH secretion through different mechanisms in man. *Regul Pept*, **31**, 1, pp. 53-64.
- Masuda Y., Tanaka T., Inomata N., *et al.* (2000), Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **276**, 3, pp. 905-8.
- Masuzaki H., Ogawa Y., Sagawa N., *et al.* (1997), Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*, **3**, 9, pp. 1029-33.
- Matsubara S., Sato M., Mizobuchi M., *et al.* (1995), Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology*, **136**, 9, pp. 4147-50.
- Matsuda K., Miura T., Kaiya H., *et al.* (2006), Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelin in the goldfish. *Peptides*, **27**, 9, pp. 2321-5.
- Mayo K. E. (1992), Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol*, **6**, 10, pp. 1734-44.
- McKee K. K., Tan C. P., Palyha O. C., *et al.* (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**, 3, pp. 426-34.
- McMahon L. R., Wellman P. J. (1997), Decreased intake of a liquid diet in nonfood-deprived rats following intra-PVN injections of GLP-1 (7-36) amide. *Pharmacol Biochem Behav*, **58**, 3, pp. 673-7.
- Melander T., Hokfelt T., Rokaeus A. (1986), Distribution of galaninlike immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, **248**, 4, pp. 475-517.
- Mercer J. G., Hoggard N., Williams L. M., *et al.* (1996), Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, **8**, 10, pp. 733-5.
- Mercer J. G., Moar K. M., Hoggard N. (1998), Localization of leptin receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid in the rodent hindbrain. *Endocrinology*, **139**, 1, pp. 29-34.
- Merchenthaler I., Vigh S., Petrusz P., *et al.* (1982), Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *Am J Anat*, **165**, 4, pp. 385-96.
- Merritt J. E., Dobson P. R., Wojcikiewicz R. J., *et al.* (1984), Studies on the involvement of calcium and calmodulin in the action of growth-hormone-releasing factor. *Biosci Rep*, **4**, 12, pp. 995-1000.

Meyer C. W., Korthaus D., Jagla W., *et al.* (2004), A novel missense mutation in the mouse growth hormone gene causes semidominant dwarfism, hyperghrelinemia, and obesity. *Endocrinology*, **145**, 5, pp. 2531-41.

Miki N., Ono M., Miyoshi H., *et al.* (1989), Hypothalamic growth hormone-releasing factor (GRF) participates in the negative feedback regulation of growth hormone secretion. *Life Sci*, **44**, 7, pp. 469-76.

Miki N., Ono M., Shizume K. (1984), Evidence that opiate and alpha-adrenergic mechanisms stimulate rat growth hormone release via growth hormone-releasing factor (GRF). *Endocrinology*, **114**, 5, pp. 1950-2.

Miki N., Ono M., Shizume K. (1988), Withdrawal of endogenous somatostatin induces secretion of growth hormone-releasing factor in rats. *J Endocrinol*, **117**, 2, pp. 245-52.

Minami S., Kamegai J., Hasegawa O., *et al.* (1993), Expression of growth hormone receptor gene in rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, **5**, 6, pp. 691-6.

Mitsugi N., Arita J., Kimura F. (1990), Effects of intracerebroventricular administration of growth hormone-releasing factor and corticotropin-releasing factor on somatostatin secretion into rat hypophysial portal blood. *Neuroendocrinology*, **51**, 1, pp. 93-6.

Mojsov S., Heinrich G., Wilson I. B., *et al.* (1986), Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem*, **261**, 25, pp. 11880-9.

Moller N., Jorgensen J. O., Abildgaard N., *et al.* (1991), Effects of growth hormone on glucose metabolism. *Horm Res*, **36 Suppl 1**, pp. 32-5.

Montague C. T., Farooqi I. S., Whitehead J. P., *et al.* (1997), Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, **387**, 6636, pp. 903-8.

Moreno-Reyes R., Kerkhofs M., L'Hermite-Baleriaux M., *et al.* (1998), Evidence against a role for the growth hormone-releasing peptide axis in human slow-wave sleep regulation. *Am J Physiol*, **274**, 5 Pt 1, pp. E779-84.

Mounier F., Bluet-Pajot M. T., Viollet C., *et al.* (1995), Effects of chronic octreotide treatment on GH secretory dynamics and tumor growth in rats bearing an ectopic somatotroph (GC) tumor. *J Neuroendocrinol*, **7**, 8, pp. 645-51.

Mounier F., Pellegrini E., Kordon C., *et al.* (1997), Continuous intracerebroventricular administration of a corticotropin releasing hormone antagonist amplifies spontaneous growth hormone pulses in the rat. *J Endocrinol*, **152**, 3, pp. 431-6.

Mountjoy K. G., Mortrud M. T., Low M. J., *et al.* (1994), Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol*, **8**, 10, pp. 1298-308.

Mozid A. M., Tringali G., Forsling M. L., *et al.* (2003), Ghrelin is released from rat hypothalamic explants and stimulates corticotrophin-releasing hormone and arginine-vasopressin. *Horm Metab Res*, **35**, 8, pp. 455-9.

Muccioli G., Papotti M., Locatelli V., *et al.* (2001), Binding of 125I-labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland. *J Endocrinol Invest*, **24**, 3, pp. RC7-9.

Muller M. B., Keck M. E., Zimmermann S., *et al.* (2000), Disruption of feeding behavior in CRH receptor 1-deficient mice is dependent on glucocorticoids. *Neuroreport*, **11**, 9, pp. 1963-6.

Murakami Y., Kato Y., Kabayama Y., *et al.* (1987), Involvement of hypothalamic growth hormone (GH)-releasing factor in GH secretion induced by intracerebroventricular injection of somatostatin in rats. *Endocrinology*, **120**, 1, pp. 311-6.

Murata M., Okimura Y., Iida K., *et al.* (2002), Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem*, **277**, 7, pp. 5667-74.

Murray H. E., Simonian S. X., Herbison A. E., *et al.* (1999), Ontogeny and sexual differentiation of somatostatin biosynthesis and secretion in the hypothalamic periventricular-median eminence pathway. *J Neuroendocrinol*, **11**, 1, pp. 35-42.

Nagaya N., Kojima M., Uematsu M., *et al.* (2001), Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **280**, 5, pp. R1483-7.

Nakagawa E., Nagaya N., Okumura H., *et al.* (2002), Hyperglycaemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. *Clin Sci (Lond)*, **103**, 3, pp. 325-8.

Nakazato M., Murakami N., Date Y., *et al.* (2001), A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, **409**, 6817, pp. 194-8.

Nambu T., Sakurai T., Mizukami K., *et al.* (1999), Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res*, **827**, 1-2, pp. 243-60.

Nanzer A. M., Khalaf S., Mozid A. M., *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**, 2, pp. 233-40.

Nass R., Toogood A. A., Hellmann P., *et al.* (2000), Intracerebroventricular administration of the rat growth hormone (GH) receptor antagonist G118R stimulates GH secretion: evidence for the existence of short loop negative feedback of GH. *J Neuroendocrinol*, **12**, 12, pp. 1194-9.

Neary N. M., Druce M. R., Small C. J., *et al.* (2006), Acylated ghrelin stimulates food intake in the fed and fasted states but desacylated ghrelin has no effect. *Gut*, **55**, 1, pp. 135.

Niall H. D., Hogan M. L., Sauer R., *et al.* (1971), Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 4, pp. 866-70.

Niimi M., Takahara J., Sato M., *et al.* (1989), Sites of origin of growth hormone-releasing factor-containing neurons projecting to the stalk-median eminence of the rat. *Peptides*, **10**, 3, pp. 605-8.

Niimi M., Takahara J., Sato M., *et al.* (1990), Immunohistochemical identification of galanin and growth hormone-releasing factor-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Neuroendocrinology*, **51**, 5, pp. 572-5.

Nishi Y., Hiejima H., Hosoda H., *et al.* (2005), Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. *Endocrinology*, **146**, 5, pp. 2255-64.

Nogueiras R., Pfluger P., Tovar S., *et al.* (2006), Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology*, pp.

Obici S., Feng Z., Morgan K., *et al.* (2002), Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes*, **51**, 2, pp. 271-5.

Ohtsuka M., Hisano S., Daikoku S. (1983), Electronmicroscopic study of somatostatin-containing neurons in rat arcuate nucleus with special reference to neuronal regulation. *Brain Res*, **263**, 2, pp. 191-9.

Okada K., Ishii S., Minami S., *et al.* (1996), Intracerebroventricular administration of the growth hormone-releasing peptide KP-102 increases food intake in free-feeding rats. *Endocrinology*, **137**, 11, pp. 5155-8.

Ono N., Lumpkin M. D., Samson W. K., *et al.* (1984), Intrahypothalamic action of corticotrophin-releasing factor (CRF) to inhibit growth hormone and LH release in the rat. *Life Sci*, **35**, 10, pp. 1117-23.

Ottosson M., Vikman-Adolfsson K., Enerback S., *et al.* (1995), Growth hormone inhibits lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*, **80**, 3, pp. 936-41.

Pagani S., Meazza C., Travaglini P., *et al.* (2005), Serum cytokine levels in GH-deficient children during substitutive GH therapy. *Eur J Endocrinol*, **152**, 2, pp. 207-10.

Painson J. C., Tannenbaum G. S. (1991), Sexual dimorphism of somatostatin and growth hormone-releasing factor signaling in the control of pulsatile growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, **128**, 6, pp. 2858-66.

Palkovits M., Rokaeus A., Antoni F. A., *et al.* (1987), Galanin in the hypothalamo-hypophyseal system. *Neuroendocrinology*, **46**, 5, pp. 417-23.

Pang J. J., Xu R. K., Xu X. B., *et al.* (2004), Hexarelin protects rat cardiomyocytes from angiotensin II-induced apoptosis in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **286**, 3, pp. H1063-9.

- Papotti M., Ghe C., Cassoni P., *et al.* (2000), Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 10, pp. 3803-7.
- Parmar R. M., Chan W. W., Dashkevicz M., *et al.* (1999), Nonpeptidyl somatostatin agonists demonstrate that sst2 and sst5 inhibit stimulated growth hormone secretion from rat anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **263**, 2, pp. 276-80.
- Patel Y. C. (1997), Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *J Endocrinol Invest*, **20**, 6, pp. 348-67.
- Patel Y. C., Greenwood M. T., Panetta R., *et al.* (1995), The somatostatin receptor family. *Life Sci*, **57**, 13, pp. 1249-65.
- Patterson M., Murphy K. G., le Roux C. W., *et al.* (2005), Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**, 4, pp. 2205-11.
- Pedrazzini T., Seydoux J., Kunstner P., *et al.* (1998), Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. *Nat Med*, **4**, 6, pp. 722-6.
- Peino R., Baldelli R., Rodriguez-Garcia J., *et al.* (2000), Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *Eur J Endocrinol*, **143**, 6, pp. R11-4.
- Pellegrini E., Bluet-Pajot M. T., Mounier F., *et al.* (1996), Central administration of a growth hormone (GH) receptor mRNA antisense increases GH pulsatility and decreases hypothalamic somatostatin expression in rats. *J Neurosci*, **16**, 24, pp. 8140-8.
- Peterfreund R. A., Vale W. W. (1984), Somatostatin analogs inhibit somatostatin secretion from cultured hypothalamus cells. *Neuroendocrinology*, **39**, 5, pp. 397-402.
- Pierroz D. D., Catzeflis C., Aebi A. C., *et al.* (1996), Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats. *Endocrinology*, **137**, 1, pp. 3-12.
- Plotsky P. M., Vale W. (1985), Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. *Science*, **230**, 4724, pp. 461-3.
- Poggioli R., Vergoni A. V., Bertolini A. (1986), ACTH-(1-24) and alpha-MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists. *Peptides*, **7**, 5, pp. 843-8.
- Preil J., Muller M. B., Gesing A., *et al.* (2001), Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in mice deficient for CRH receptors 1 and 2. *Endocrinology*, **142**, 11, pp. 4946-55.
- Pringle P. J., Di Silvio L., Hindmarsh P. C., *et al.* (1992), Analysis of trough serum growth hormone concentrations: comparison of an immunoradiometric assay and a sensitive ELISA for growth hormone. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **37**, 2, pp. 169-74.

- Qu D., Ludwig D. S., Gammeltoft S., *et al.* (1996), A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, **380**, 6571, pp. 243-7.
- Quillan J. M., Sadee W., Wei E. T., *et al.* (1998), A synthetic human Agouti-related protein-(83-132)-NH₂ fragment is a potent inhibitor of melanocortin receptor function. *FEBS Lett*, **428**, 1-2, pp. 59-62.
- Quintela M., Senaris R., Heiman M. L., *et al.* (1997), Leptin inhibits in vitro hypothalamic somatostatin secretion and somatostatin mRNA levels. *Endocrinology*, **138**, 12, pp. 5641-4.
- Rabii J., Knapp L., De La Guardia A., *et al.* (1984), Brain sites involved in the regulation of growth hormone secretion in the young male domestic fowl. *J Endocrinol*, **103**, 3, pp. 327-32.
- Rauma J., Spangeus A., El-Salhy M. (2006), Ghrelin cell density in the gastrointestinal tracts of animal models of human diabetes. *Histol Histopathol*, **21**, 1, pp. 1-5.
- Raynor K., Reisine T. (1989), Analogs of somatostatin selectively label distinct subtypes of somatostatin receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, **251**, 2, pp. 510-7.
- Reisine T., Bell G. I. (1995), Molecular properties of somatostatin receptors. *Neuroscience*, **67**, 4, pp. 777-90.
- Rettori V., Milenkovic L., Aguila M. C., *et al.* (1990), Physiologically significant effect of neuropeptide Y to suppress growth hormone release by stimulating somatostatin discharge. *Endocrinology*, **126**, 5, pp. 2296-301.
- Ribases M., Gratacos M., Fernandez-Aranda F., *et al.* (2005), Association of BDNF with restricting anorexia nervosa and minimum body mass index: a family-based association study of eight European populations. *Eur J Hum Genet*, **13**, 4, pp. 428-34.
- Richardson S., Twente S., Audhya T. (1988), GHRF causes biphasic stimulation of SRIF secretion from rat hypothalamic cells. *Am J Physiol*, **255**, 6 Pt 1, pp. E829-32.
- Riley L. G., Hirano T., Grau E. G. (2002), Rat ghrelin stimulates growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoolog Sci*, **19**, 7, pp. 797-800.
- Rinderknecht E., Humbel R. E. (1978), Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett*, **89**, 2, pp. 283-6.
- Rivier C., Brown M., Vale W. (1977), Effect of neurotensin, substance P and morphine sulfate on the secretion of prolactin and growth hormone in the rat. *Endocrinology*, **100**, 3, pp. 751-4.
- Rivier C., Vale W., Ling N., *et al.* (1977), Stimulation in vivo of the secretion of prolactin and growth hormone by beta-endorphin. *Endocrinology*, **100**, 1, pp. 238-41.
- Rivier J., Spiess J., Thorner M., *et al.* (1982), Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature*, **300**, 5889, pp. 276-8.

Robinson I. C. (1991), The growth hormone secretory pattern: a response to neuroendocrine signals. *Acta Paediatr Scand Suppl*, **372**, pp. 70-8; discussion 79-80.

Rogers K. V., Vician L., Steiner R. A., *et al.* (1988), The effect of hypophysectomy and growth hormone administration on pre-prosomatostatin messenger ribonucleic acid in the periventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Endocrinology*, **122**, 2, pp. 586-91.

Rosenbloom A. L. (2000), Physiology and disorders of the growth hormone receptor (GHR) and GH-GHR signal transduction. *Endocrine*, **12**, 2, pp. 107-19.

Rosenfeld R. G., Ceda G., Wilson D. M., *et al.* (1984), Characterization of high affinity receptors for insulin-like growth factors I and II on rat anterior pituitary cells. *Endocrinology*, **114**, 5, pp. 1571-5.

Rossi M., Kim M. S., Morgan D. G., *et al.* (1998), A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology*, **139**, 10, pp. 4428-31.

Sainsbury A., Schwarzer C., Couzens M., *et al.* (2002), Important role of hypothalamic Y2 receptors in body weight regulation revealed in conditional knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13, pp. 8938-43.

Sainsbury A., Schwarzer C., Couzens M., *et al.* (2002), Y4 receptor knockout rescues fertility in ob/ob mice. *Genes Dev*, **16**, 9, pp. 1077-88.

Saito Y., Cheng M., Leslie F. M., *et al.* (2001), Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol*, **435**, 1, pp. 26-40.

Sakurai T. (2002), Roles of orexins in regulation of feeding and wakefulness. *Neuroreport*, **13**, 8, pp. 987-95.

Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., *et al.* (1998), Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, **92**, 4, pp. 573-85.

Sarret P., Botto J. M., Vincent J. P., *et al.* (1998), Preferential expression of sst2A over sst2B somatostatin receptor splice variant in rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology*, **68**, 1, pp. 37-43.

Sartor O., Bowers C. Y., Reynolds G. A., *et al.* (1985), Variables determining the growth hormone response of His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ in the rat. *Endocrinology*, **117**, 4, pp. 1441-7.

Sato M., Frohman L. A. (1993), Differential effects of central and peripheral administration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor on hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin gene expression in GH-deficient dwarf rats. *Endocrinology*, **133**, 2, pp. 793-9.

Sawchenko P. E., Swanson L. W., Rivier J., *et al.* (1985), The distribution of growth-hormone-releasing factor (GRF) immunoreactivity in the central nervous system of the rat: an

immunohistochemical study using antisera directed against rat hypothalamic GRF. *J Comp Neurol*, **237**, 1, pp. 100-15.

Schertzer J. D., Lynch G. S. (2006), Comparative evaluation of IGF-I gene transfer and IGF-I protein administration for enhancing skeletal muscle regeneration after injury. *Gene Ther*, pp.

Schindler M., Kidd E. J., Carruthers A. M., *et al.* (1998), Molecular cloning and functional characterization of a rat somatostatin sst2(b) receptor splice variant. *Br J Pharmacol*, **125**, 1, pp. 209-17.

Schmid D. A., Held K., Ising M., *et al.* (2005), Ghrelin stimulates appetite, imagination of food, GH, ACTH, and cortisol, but does not affect leptin in normal controls. *Neuropsychopharmacology*, **30**, 6, pp. 1187-92.

Schonbrunn A., Tashjian H., Jr. (1978), Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture. *J Biol Chem*, **253**, 18, pp. 6473-83.

Schwartz M. W., Figlewicz D. P., Baskin D. G., *et al.* (1992), Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev*, **13**, 3, pp. 387-414.

Schwartz M. W., Marks J. L., Sipols A. J., *et al.* (1991), Central insulin administration reduces neuropeptide Y mRNA expression in the arcuate nucleus of food-deprived lean (Fa/Fa) but not obese (fa/fa) Zucker rats. *Endocrinology*, **128**, 5, pp. 2645-7.

Schwartz M. W., Seeley R. J., Woods S. C., *et al.* (1997), Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*, **46**, 12, pp. 2119-23.

Schwartz M. W., Sipols A., Kahn S. E., *et al.* (1990), Kinetics and specificity of insulin uptake from plasma into cerebrospinal fluid. *Am J Physiol*, **259**, 3 Pt 1, pp. E378-83.

Seeley R. J., van Dijk G., Campfield L. A., *et al.* (1996), Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. *Horm Metab Res*, **28**, 12, pp. 664-8.

Seeley R. J., Yagaloff K. A., Fisher S. L., *et al.* (1997), Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature*, **390**, 6658, pp. 349.

Senaris R. M., Humphrey P. P., Emson P. C. (1994), Distribution of somatostatin receptors 1, 2 and 3 mRNA in rat brain and pituitary. *Eur J Neurosci*, **6**, 12, pp. 1883-96.

Seoane L. M., Tovar S., Baldelli R., *et al.* (2000), Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats. *Eur J Endocrinol*, **143**, 5, pp. R7-9.

Shanado Y., Kometani M., Uchiyama H., *et al.* (2004), Lysophospholipase I identified as a ghrelin deacylation enzyme in rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun*, **325**, 4, pp. 1487-94.

Shibasaki T., Yamauchi N., Hotta M., *et al.* (1986), In vitro release of growth hormone-releasing factor from rat hypothalamus: effect of insulin-like growth factor-1. *Regul Pept*, **15**, 1, pp. 47-53.

Shibasaki T., Yamauchi N., Takeuchi K., *et al.* (1998), The growth hormone secretagogue KP-102-induced stimulation of food intake is modified by fasting, restraint stress, and somatostatin in rats. *Neurosci Lett*, **255**, 1, pp. 9-12.

Shiiba T., Nakazato M., Mizuta M., *et al.* (2002), Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 1, pp. 240-4.

Shintani M., Ogawa Y., Ebihara K., *et al.* (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**, 2, pp. 227-32.

Shome B., Parlow A. F. (1977), Human pituitary prolactin (hPRL): the entire linear amino acid sequence. *J Clin Endocrinol Metab*, **45**, 5, pp. 1112-5.

Shuto Y., Shibasaki T., Otagiri A., *et al.* (2002), Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest*, **109**, 11, pp. 1429-36.

Silva A. P., Bethmann K., Raulf F., *et al.* (2005), Regulation of ghrelin secretion by somatostatin analogs in rats. *Eur J Endocrinol*, **152**, 6, pp. 887-94.

Sinha Y. N., Baxter S. R. (1978), Concentrations and chromatographic profile of serum GH in old ob/ob mice. *Horm Metab Res*, **10**, 5, pp. 454-5.

Sinton C. M., Fitch T. E., Gershenfeld H. K. (1999), The effects of leptin on REM sleep and slow wave delta in rats are reversed by food deprivation. *J Sleep Res*, **8**, 3, pp. 197-203.

Sipols A. J., Baskin D. G., Schwartz M. W. (1995), Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes*, **44**, 2, pp. 147-51.

Smagin G. N., Howell L. A., Ryan D. H., *et al.* (1998), The role of CRF2 receptors in corticotropin-releasing factor- and urocortin-induced anorexia. *Neuroreport*, **9**, 7, pp. 1601-6.

Smart J. L., Tolle V., Low M. J. (2006), Glucocorticoids exacerbate obesity and insulin resistance in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. *J Clin Invest*, **116**, 2, pp. 495-505.

Smith R. G. (2005), Development of growth hormone secretagogues. *Endocr Rev*, **26**, 3, pp. 346-60.

Smith R. G., Griffin P. R., Xu Y., *et al.* (2000), Adenosine: A partial agonist of the growth hormone secretagogue receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **276**, 3, pp. 1306-13.

- Smith R. M., Howe P. R., Oliver J. R., *et al.* (1984), Growth hormone releasing factor immunoreactivity in rat hypothalamus. *Neuropeptides*, **4**, 2, pp. 109-15.
- Son M. H., Kang K. W., Kim E. J., *et al.* (2000), Role of glucose utilization in the restoration of hypophysectomy-induced hepatic cytochrome P450 2E1 by growth hormone in rats. *Chem Biol Interact*, **127**, 1, pp. 13-28.
- Sonntag W. E., Steger R. W., Forman L. J., *et al.* (1980), Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology*, **107**, 6, pp. 1875-9.
- Spencer S. A., Hammonds R. G., Henzel W. J., *et al.* (1988), Rabbit liver growth hormone receptor and serum binding protein. Purification, characterization, and sequence. *J Biol Chem*, **263**, 16, pp. 7862-7.
- Spielman B. J. (1993), Conflict in medical ethics cases: seeking patterns of resolution. *J Clin Ethics*, **4**, 3, pp. 212-8.
- Spieß J., Rivier J., Rivier C., *et al.* (1981), Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 10, pp. 6517-21.
- Spieß J., Rivier J., Vale W. (1983), Characterization of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature*, **303**, 5917, pp. 532-5.
- Spinazzi R., Andreis P. G., Nussdorfer G. G. (2005), Neuropeptide-Y and Y-receptors in the autocrine-paracrine regulation of adrenal gland under physiological and pathophysiological conditions (Review). *Int J Mol Med*, **15**, 1, pp. 3-13.
- Spiteri-Grech J., Nieschlag E. (1992), The role of growth hormone and insulin-like growth factor I in the regulation of male reproductive function. *Horm Res*, **38**, Suppl 1, pp. 22-7.
- Srikant C. B., Patel Y. C. (1981), Somatostatin receptors: identification and characterization in rat brain membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 6, pp. 3930-4.
- Stanley B. G., Anderson K. C., Grayson M. H., *et al.* (1989), Repeated hypothalamic stimulation with neuropeptide Y increases daily carbohydrate and fat intake and body weight gain in female rats. *Physiol Behav*, **46**, 2, pp. 173-7.
- Stanley B. G., Kyrkouli S. E., Lampert S., *et al.* (1986), Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides*, **7**, 6, pp. 1189-92.
- Stellar E. (1994), The physiology of motivation. 1954. *Psychol Rev*, **101**, 2, pp. 301-11.
- Stephens T. W., Basinski M., Bristow P. K., *et al.* (1995), The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*, **377**, 6549, pp. 530-2.
- Stoving R. K., Vinten J., Handberg A., *et al.* (1998), Diurnal variation of the serum leptin concentration in patients with anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **48**, 6, pp. 761-8.

Strauch G., Girault D., Rifai M., *et al.* (1973), Alpha-MSH stimulation of growth hormone release. *J Clin Endocrinol Metab*, **37**, 6, pp. 990-3.

Strober M., Freeman R., Lampert C., *et al.* (2000), Controlled family study of anorexia nervosa and bulimia nervosa: evidence of shared liability and transmission of partial syndromes. *Am J Psychiatry*, **157**, 3, pp. 393-401.

Sugino T., Yamaura J., Yamagishi M., *et al.* (2002), A transient surge of ghrelin secretion before feeding is modified by different feeding regimens in sheep. *Biochem Biophys Res Commun*, **298**, 5, pp. 785-8.

Sun Y., Wang P., Zheng H., *et al.* (2004), Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 13, pp. 4679-84.

Swanson L. W., Sawchenko P. E., Rivier J., *et al.* (1983), Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*, **36**, 3, pp. 165-86.

Szabo M., Ruestow P. C., Kramer D. E. (1985), Growth hormone response to thyrotropin-releasing hormone in the urethane-anesthetized rat: effect of thyroid status. *Endocrinology*, **117**, 1, pp. 330-7.

Szentirmai E., Krueger J. M. (2006), Central administration of neuropeptide Y induces wakefulness in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **291**, 2, pp. R473-80.

Takahashi S., Gottschall P. E., Quigley K. L., *et al.* (1987), Growth hormone secretory patterns in young, middle-aged and old female rats. *Neuroendocrinology*, **46**, 2, pp. 137-42.

Takahashi T., Okimura Y., Yoshimura K., *et al.* (1995), Regional distribution of growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor mRNA in the rat brain. *Endocrinology*, **136**, 10, pp. 4721-4.

Takaya K., Ariyasu H., Kanamoto N., *et al.* (2000), Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 12, pp. 4908-11.

Takeno R., Okimura Y., Iguchi G., *et al.* (2004), Intravenous administration of ghrelin stimulates growth hormone secretion in vagotomized patients as well as normal subjects. *Eur J Endocrinol*, **151**, 4, pp. 447-50.

Tannenbaum G. S. (1980), Evidence for autoregulation of growth hormone secretion via the central nervous system. *Endocrinology*, **107**, 6, pp. 2117-20.

Tannenbaum G. S., Epelbaum J., Bowers C. Y. (2003), Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology*, **144**, 3, pp. 967-74.

Tannenbaum G. S., Gurd W., Lapointe M. (1998), Leptin is a potent stimulator of spontaneous pulsatile growth hormone (GH) secretion and the GH response to GH-releasing hormone. *Endocrinology*, **139**, 9, pp. 3871-5.

Tannenbaum G. S., Ling N. (1984), The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology*, **115**, 5, pp. 1952-7.

Tannenbaum G. S., Martin J. B. (1976), Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, **98**, 3, pp. 562-70.

Tannenbaum G. S., McCarthy G. F., Zeitler P., *et al.* (1990), Cysteamine-induced enhancement of growth hormone-releasing factor (GRF) immunoreactivity in arcuate neurons: morphological evidence for putative somatostatin/GRF interactions within hypothalamus. *Endocrinology*, **127**, 5, pp. 2551-60.

Tannenbaum G. S., Zhang W. H., Lapointe M., *et al.* (1998), Growth hormone-releasing hormone neurons in the arcuate nucleus express both Sst1 and Sst2 somatostatin receptor genes. *Endocrinology*, **139**, 3, pp. 1450-3.

Tanoh T., Shimatsu A., Ishikawa Y., *et al.* (1993), Galanin-induced growth hormone secretion in conscious rats: evidence for a possible involvement of somatostatin. *J Neuroendocrinol*, **5**, 2, pp. 183-7.

Tatemoto K., Carlquist M., Mutt V. (1982), Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, **296**, 5858, pp. 659-60.

Tatemoto K., Rokaeus A., Jornvall H., *et al.* (1983), Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett*, **164**, 1, pp. 124-8.

Thissen J. P., Ketelslegers J. M., Underwood L. E. (1994), Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev*, **15**, 1, pp. 80-101.

Thompson N. M., Gill D. A., Davies R., *et al.* (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**, 1, pp. 234-42.

Tolle V., Bassant M. H., Zizzari P., *et al.* (2002), Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology*, **143**, 4, pp. 1353-61.

Tolle V., Zizzari P., Tomasetto C., *et al.* (2001), In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*, **73**, 1, pp. 54-61.

Tomasetto C., Karam S. M., Ribieras S., *et al.* (2000), Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: the motilin-related peptide. *Gastroenterology*, **119**, 2, pp. 395-405.

Toshinai K., Mondal M. S., Nakazato M., *et al.* (2001), Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**, 5, pp. 1220-5.

Toshinai K., Yamaguchi H., Sun Y., *et al.* (2006), Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, **147**, 5, pp. 2306-14.

Tran V. T., Beal M. F., Martin J. B. (1985), Two types of somatostatin receptors differentiated by cyclic somatostatin analogs. *Science*, **228**, 4698, pp. 492-5.

Tranchand-Bunel D., Delbende C., Guy J., *et al.* (1987), [Pro-opiomelanocortin neuronal systems]. *Rev Neurol (Paris)*, **143**, 6-7, pp. 471-89.

Tremblay F., Perreault M., Klaman L. D., *et al.* (2006), Normal food intake and body weight in mice lacking the G protein-coupled receptor GPR39. *Endocrinology*, pp.

Trudel L., Tomasetto C., Rio M. C., *et al.* (2002), Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **282**, 6, pp. G948-52.

Tschop M., Flora D. B., Mayer J. P., *et al.* (2002), Hypophysectomy prevents ghrelin-induced adiposity and increases gastric ghrelin secretion in rats. *Obes Res*, **10**, 10, pp. 991-9.

Tschop M., Smiley D. L., Heiman M. L. (2000), Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, **407**, 6806, pp. 908-13.

Tschop M., Wawarta R., Riepl R. L., *et al.* (2001), Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*, **24**, 6, pp. RC19-21.

Tsubone T., Masaki T., Katsuragi I., *et al.* (2005), Leptin downregulates ghrelin levels in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **289**, 6, pp. R1703-6.

Tsubota Y., Owada-Makabe K., Yukawa K., *et al.* (2005), Hypotensive effect of des-acyl ghrelin at nucleus tractus solitarii of rat. *Neuroreport*, **16**, 2, pp. 163-6.

Tullin S., Hansen B. S., Ankersen M., *et al.* (2000), Adenosine is an agonist of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, **141**, 9, pp. 3397-402.

Turton M. D., O'Shea D., Gunn I., *et al.* (1996), A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, **379**, 6560, pp. 69-72.

Tzanela M., Wagner C., Tannenbaum G. S. (1997), Recombinant human growth hormone-binding protein fails to enhance the in vivo bioactivity of human growth hormone in normal rats. *Endocrinology*, **138**, 12, pp. 5316-24.

Uchiyama T., Kaji H., Abe H., *et al.* (1994), Negative regulation of hypothalamic growth hormone-releasing factor messenger ribonucleic acid by growth hormone and insulin-like growth factor I. *Neuroendocrinology*, **59**, 5, pp. 441-50.

Ukkola O., Ravussin E., Jacobson P., *et al.* (2002), Role of ghrelin polymorphisms in obesity based on three different studies. *Obes Res*, **10**, 8, pp. 782-91.

Van Cauter E., Leproult R., Kupfer D. J. (1996), Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. *J Clin Endocrinol Metab*, **81**, 7, pp. 2468-73.

van den Berg G., Veldhuis J. D., Frolich M., *et al.* (1996), An amplitude-specific divergence in the pulsatile mode of growth hormone (GH) secretion underlies the gender difference in mean GH concentrations in men and premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, **81**, 7, pp. 2460-7.

Vanetti M., Kouba M., Wang X., *et al.* (1992), Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). *FEBS Lett*, **311**, 3, pp. 290-4.

Villareal D. T., Morley J. E. (1994), Trophic factors in aging. Should older people receive hormonal replacement therapy? *Drugs Aging*, **4**, 6, pp. 492-509.

Vink T., Hinney A., van Elburg A. A., *et al.* (2001), Association between an agouti-related protein gene polymorphism and anorexia nervosa. *Mol Psychiatry*, **6**, 3, pp. 325-8.

Volante M., Allia E., Fulcheri E., *et al.* (2003), Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor growth. *Am J Pathol*, **162**, 2, pp. 645-54.

Wagner C., Caplan S. R., Tannenbaum G. S. (1998), Genesis of the ultradian rhythm of GH secretion: a new model unifying experimental observations in rats. *Am J Physiol*, **275**, 6 Pt 1, pp. E1046-54.

Wang M. Y., Zhou Y. T., Newgard C. B., *et al.* (1996), A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett*, **392**, 2, pp. 87-90.

Waters M. J., Barnard R. T., Lobie P. E., *et al.* (1990), Growth hormone receptors--their structure, location and role. *Acta Paediatr Scand Suppl*, **366**, pp. 60-72.

Wehrenberg W. B., Brazeau P., Luben R., *et al.* (1982), Inhibition of the pulsatile secretion of growth hormone by monoclonal antibodies to the hypothalamic growth hormone releasing factor (GRF). *Endocrinology*, **111**, 6, pp. 2147-8.

Weikel J. C., Wichniak A., Ising M., *et al.* (2003), Ghrelin promotes slow-wave sleep in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **284**, 2, pp. E407-15.

Wettschureck N., Moers A., Wallenwein B., *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**, 5, pp. 1942-8.

White D. W., Tartaglia L. A. (1996), Leptin and OB-R: body weight regulation by a cytokine receptor. *Cytokine Growth Factor Rev*, **7**, 4, pp. 303-9.

Willesen M. G., Kristensen P., Romer J. (1999), Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*, **70**, 5, pp. 306-16.

Williams T., Maxon H., Thorner M. O., *et al.* (1985), Blunted growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone in hypothyroidism resolves in the euthyroid state. *J Clin Endocrinol Metab*, **61**, 3, pp. 454-6.

Willoughby J. O., Brogan M., Kapoor R. (1989), Hypothalamic interconnections of somatostatin and growth hormone releasing factor neurons. *Neuroendocrinology*, **50**, 5, pp. 584-91.

Willoughby J. O., Menadue M., Zeegers P., *et al.* (1980), Effects of human growth hormone on the secretion of rat growth hormone. *J Endocrinol*, **86**, 1, pp. 165-9.

Winer L. M., Shaw M. A., Baumann G. (1990), Basal plasma growth hormone levels in man: new evidence for rhythmicity of growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, **70**, 6, pp. 1678-86.

Woods S. C., Lotter E. C., McKay L. D., *et al.* (1979), Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*, **282**, 5738, pp. 503-5.

Wren A. M., Seal L. J., Cohen M. A., *et al.* (2001), Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 12, pp. 5992.

Wren A. M., Small C. J., Abbott C. R., *et al.* (2001), Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes*, **50**, 11, pp. 2540-7.

Wren A. M., Small C. J., Fribbens C. V., *et al.* (2002), The hypothalamic mechanisms of the hypophysiotropic action of ghrelin. *Neuroendocrinology*, **76**, 5, pp. 316-24.

Wren A. M., Small C. J., Ward H. L., *et al.* (2000), The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, **141**, 11, pp. 4325-8.

Yakar S., Liu J. L., Stannard B., *et al.* (1999), Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13, pp. 7324-9.

Yamada H., Okumura T., Motomura W., *et al.* (2000), Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **267**, 2, pp. 527-31.

Yamanaka A., Sakurai T., Katsumoto T., *et al.* (1999), Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res*, **849**, 1-2, pp. 248-52.

Yamashita S., Melmed S. (1986), Insulin-like growth factor I action on rat anterior pituitary cells: suppression of growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*, **118**, 1, pp. 176-82.

Yeo G. S., Farooqi I. S., Aminian S., *et al.* (1998), A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet*, **20**, 2, pp. 111-2.

Yildiz B. O., Suchard M. A., Wong M. L., *et al.* (2004), Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 28, pp. 10434-9.

Yokoyama M., Nakahara K., Kojima M., *et al.* (2005), Influencing the between-feeding and endocrine responses of plasma ghrelin in healthy dogs. *Eur J Endocrinol*, **152**, 1, pp. 155-60.

Zamir N., Skofitsch G., Bannon M. J., *et al.* (1986), Melanin-concentrating hormone: unique peptide neuronal system in the rat brain and pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 5, pp. 1528-31.

Zhan X., Giorgianni F., Desiderio D. M. (2005), Proteomics analysis of growth hormone isoforms in the human pituitary. *Proteomics*, **5**, 5, pp. 1228-41.

Zhang J. V., Ren P. G., Avsian-Kretchmer O., *et al.* (2005), Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science*, **310**, 5750, pp. 996-9.

Zhang Y., Proenca R., Maffei M., *et al.* (1994), Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372**, 6505, pp. 425-32.

Zheng H., Bailey A., Jiang M. H., *et al.* (1997), Somatostatin receptor subtype 2 knockout mice are refractory to growth hormone-negative feedback on arcuate neurons. *Mol Endocrinol*, **11**, 11, pp. 1709-17.

Zhou Y., Xu B. C., Maheshwari H. G., *et al.* (1997), A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 24, pp. 13215-20.

Zhu X., Cao Y., Voodg K., *et al.* (2006), On the processing of proghrelin to ghrelin. *J Biol Chem*, pp.

ANNEXES

MATERIEL ET METHODES

Animaux

Les expériences faisant l'objet de ce travail ont été réalisées chez le rat mâle Sprague Dawley âgé de 2 à 3 mois, à l'exception d'une étude réalisée chez la souris C57 Bl6 (3^{ème} partie)

Dès leur arrivée, 4 à 5 semaines avant le début de l'expérience, les animaux sont

- hébergés dans des cages individuelles,
- nourris ad libidum,
- soumis à un cycle lumière/obscurité de 12h /12h, l'heure d'extinction étant fonction de la problématique étudiée. L'acclimatation à de tels cycles est importante. D'une part un pic de sécrétion de GH apparaissant à l'extinction des lumières (Tannenbaum 74) cette acclimatation nous permet de synchroniser l'apparition des pics d'un animal à l'autre et ainsi de mettre en évidence plus facilement l'effet inhibiteur d'une drogue ou une modification du rythme. D'autre part elle nous permet d'étudier le comportement alimentaire des animaux dans des périodes où ils mangent peu (diurne) et dans des périodes où ils mangent (nocturne)
- régulièrement manipulés afin d'éviter au maximum le stress de manipulation le jour de l'expérience. Chez le rat le stress inhibe la sécrétion de GH.
- régulièrement pesés ce qui permet de vérifier leur bon état de santé notamment après chirurgie.

Prélèvements sanguins

Les expériences in vivo sont réalisées chez l'animal vigile, libre de ses mouvements. En effet la plupart des anesthésiques modifient la sécrétion de GH et le comportement alimentaire ne peut être étudié simultanément que si l'animal est vigile.

Les animaux sont porteurs d'une canule intracardiaque à demeure qui est implantée au moins 48h avant l'expérience et qui permet de faire des prélèvements sanguins et d'injecter des drogues en intraveineux sans perturber l'animal.

Le jour de l'exploration endocrinienne, 2 heures avant le début des prélèvements sanguins, la canule intracardiaque est connectée à un cathéter relié à une seringue remplie de solution physiologique héparinée (25UI /ml). Les prélèvements sanguins ont lieu toutes les 5, 10, 15 ou 20 minutes selon le protocole défini et la quantité de sang prélevé dépend des dosages prévus. En général 0,15 à 0,25 ml de sang sont recueillis dans des tubes contenant un

anticoagulant (EDTA) et éventuellement un inhibiteur de protéases (PHMB) puis centrifugés. Le plasma collecté est ensuite aliquoté et congelé le plus rapidement possible jusqu'aux dosages. Afin de ne pas modifier l'équilibre hémodynamique une quantité de sang équivalente à celle prélevée est réinjectée tous les 2 à 3 prélèvements.

Comportement alimentaire

3 mesures ont été réalisées :

- Mesure du temps passé à manger par intervalles de 10 min
- Pesée de la quantité de nourriture ingérée pendant un temps défini. Dans ce cas les animaux sont habitués pendant les jours qui précèdent à ce que la nourriture soit introduite et enlevée dans les mêmes conditions que celles de l'expérience
- Enregistrement en continu des quantités de nourriture et d'eau consommées grâce au système de la société TSE (Drinking and feeding Monitor). Ce système se compose :
 - D'une station pour la boisson qui comprend un biberon en verre suspendu à un détecteur qui mesure la quantité de liquide consommé par l'animal.
 - D'une station pour la nourriture où la nourriture standard solide est déposée dans un panier qui est accroché à un capteur. L'animal y accède à travers une grille comme il le fait généralement dans les cages ordinaires.

La nourriture et l'eau de boisson sont pesées en continu. Le signal est enregistré par le système, à une vitesse maximum de 10 enregistrements/s. Les données sont analysées grâce au logiciel fourni avec le système et à excel.

Les animaux sont habitués à leur nouvel environnement au moins 3 semaines avant le début des expériences.

Traitements

Les traitements aigus sont administrés soit par voie intrapéritonéale, soit par voie veineuse via la canule intracardiaque à demeure.

L'administration continue de drogues se fait grâce à des minipompes osmotiques (Alzet) introduites sous la peau et qui peuvent être reliées à des canules implantées dans le ventricule latéral en condition stéréotaxique dans le cas de traitement ICV. Les pompes que nous avons utilisées ont un débit continu de 0,5ul/h

Les coordonnées stéréotaxiques utilisées pour l'implantation de la canule dans le ventricule latéral ont été définies à l'aide de l'atlas de Paxinos Watson (86) et sont les suivantes :

A (antériorité) :-0,8 mm/bregma

L (latéralité) : -1,5 mm/bregma

H (hauteur) : -3,8 mm/bregma

avec la pièce de gueule dans laquelle sont placées les incisives de l'animal positionnée à -3,3 mm au dessous de la ligne interaurale. La canule est fixée sur la calotte osseuse à l'aide de vis et de ciment dentaire et est reliée à la pompe par un cathéter en tygon qui contient les séquences de drogues à injecter. Son bon positionnement est contrôlé à la fin de l'expérience par injection de bleu trypan.

Chirurgie gastrique, bypass ou anneau gastrique

Deux types de chirurgie gastrique ont été réalisées chez le rat (Schéma) :

- Le duodénum et le jéjunum ont été exclus de la continuité digestive. Cette dérivation a été réalisée sans modification du volume de l'estomac.
- Un anneau gastrique a été posé en dessous de la jonction gastro-oesophagienne. La longueur de cet anneau a été calibrée de telle sorte qu'elle procure le même niveau de restriction gastrique chez tous les animaux.

Etude in vitro, périfusion d'hypophyse :

L'étude de l'action de certains peptides sur la sécrétion de GH à partir d'hypophyses in vitro a été réalisée sur un système d'hypophyse en périfusion.

Après décapitation des rats, les hypophyses antérieures sont récupérées et lavées pendant 30 min avec du milieu de culture oxygéné (DMEM, L-glutamine, 4,5 g de glucose, HEPES 25mM, BSA 0,1%). Elles sont ensuite placées dans des chambres de périfusion. Le milieu circule au travers de ces chambres avec un débit de 0,1 ml/min. Après une période d'équilibration de 2 heures, l'effluent est collecté toutes les 5 minutes. Les peptides à tester sont ajoutés au milieu pendant une période de 15 minutes. Les échantillons sont congelés jusqu'au jour de dosage de la GH

Dosages

La concentration des différentes hormones périphériques a été évaluée par dosages immunoenzymatique (GH, Ghrelina) ou radioimmunologique (Obestatine). Les dosages utilisés sont de type compétitif : il y a compétition entre l'hormone à doser et une hormone de synthèse couplée à l'acétylcholinestérase (GH, Ghrelina) ou à l'iode 125 (Obestatine) pour la fixation sur un anticorps spécifique. La détermination des concentrations plasmatiques de l'hormone s'effectue par rapport à une courbe étalon réalisée à partir de différentes dilutions d'une solution standard.

- **GH**

L'anticorps polyclonal utilisé pour doser la GH de rat a été développé chez la chèvre (Don du Dr. S. Mamas, Institut Pasteur, Paris), il reconnaît spécifiquement la GH de rat. La réaction croisée de cet anticorps avec les autres hormones hypophysaires et la GH humaine est inférieure à 1%. Le traceur a été réalisé en couplant la GH de rat à l'acétylcholinestérase (Spibio, Saclay, France). Le standard est de la GH de rat (NIDDK, rGH-RP3). La sensibilité du dosage est de 0,6 ng/ml, et les coefficients de variation intra et inter dosage sont respectivement de 4 and 14%.

- **Ghrelina**

Les anticorps polyclonaux utilisés pour doser la ghrelina totale (Don du Dr. C. Tomasetto, IGBMC, Strasbourg, France) et la ghrelina octanoylée (Don du Dr. Hosoda, Osaka, Japon) ont été réalisés chez le lapin. L'anticorps N terminal ne reconnaît que la forme octanoylée (anticorps préparé à partir des acides aminés 1-11 avec octanoylation de la serine en position 3). L'anticorps C terminal reconnaît quant à lui les formes octanoylée et non octanoylée (anticorps préparé à partir des acides aminés 15-28). Le traceur a été réalisé en couplant la ghrelina octanoylée humaine à l'acétylcholinestérase (Spibio, Saclay, France). Le standard est de la ghrelina octanoylée de rat (NeoMPS, Strasbourg, France). La sensibilité du dosage de la ghrelina totale et de la ghrelina octanoylée est respectivement de 100 et 20 pg/ml. Les coefficients de variation intra et interassay sont de 4 et 15%.

- **Obestatine**

Les niveaux d'obestatine ont été évalués grâce à un kit commercial (Phoenix, Belmont, CA). L'anticorps polyclonal a été développé chez le lapin et reconnaît aussi bien l'obestatine (acides aminés 1 à 23) que le fragment 1-10 et ne reconnaît pas la pre-proghrelina 52-85, la pre-proghrelina 86-117 de rat, et la ghrelina octanoylée. Le traceur a

été réalisé en couplant obestatine à de l'iode 125. La sensibilité de ce dosage est de 4 pmoles/l et le coefficient de variation intra dosage est de 8 %.

Recherche de polymorphismes :

La recherche de polymorphisme a été réalisée à partir d'ADNg extrait des leucocytes suivant la technique de Miller (1998). La détection des polymorphismes a été faite sur un appareil de PCR en temps réel, ABI PRISM 7000. Pour l'AgRP, les amorces et sondes de PCR ont été choisies grâce au logiciel Primer express. Les autres polymorphismes ont été détectés grâce au « TaqMan® SNP Genotyping Assays » disponible dans le catalogue de la société Perkin Elmer. La reproductibilité de détection des SNP a été évaluée en re-analysant une partie des échantillons.

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne±SEM et les analyses statistiques sont effectuées par ANOVA et test t apparié utilisant JMP IN 5.1 software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Analyse des paramètres de pulsatilité

La fréquence d'apparition des pics de sécrétion, leur durée, leur amplitude et les valeurs basales des différentes hormones ont été déterminés grâce au logiciel Cluster 8 mis à notre disposition par Michael Johnson.

La régularité de l'apparition des pics a été évaluée par mesure de l'entropie approchée (ApEn). L'ApEn mesure la probabilité (logarithmique) pour qu'un pic apparaisse au moment où il le ferait si la rythmicité était régulière. Plus la valeur d'ApEn est grande plus le rythme est irrégulier.

Nous avons également déterminé la synchronie des pulsatilités de 2 hormones ou évènements par mesure de la Cross ApEn. La Cross ApEn quantifie les variations point par point entre 2 séries quelque soit le décalage dans le temps et donc est différente de la cross corrélation qui mesure la corrélation entre les valeurs de la série 1 et celles de la série 2 mesurées sans ou après un décalage défini de x min.

Fenêtre =1, tolérance r = 20% de S

**ARTICLES ET REVUES COMPLEMENTAIRES
SUR LES GHS ET LA GHRELININE**

Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, Rio MC, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*. 2001 Jan;73(1):54-61.

In vivo and in vitro Effects of Ghrelin/Motilin-Related Peptide on Growth Hormone Secretion in the Rat

Virginie Tolle^a Philippe Zizzari^a Catherine Tomasetto^b
Marie-Christine Rio^b Jacques Epelbaum^a Marie-Thérèse Bluet-Pajot^a

^aU159 INSERM, Paris, and ^bInstitut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM U184/ULP, Illkirch, France

Key Words

Ghrelin · Motilin-related peptide · Growth hormone · Somatostatin

Abstract

Ghrelin (Ghr), a 28 amino acid gastric peptide with an n-octanoylation on Ser 3, has recently been identified as an endogenous ligand of the growth hormone secretagogue (GHS) receptor. A cDNA was also isolated from a mouse stomach library encoding a protein named pre-promotilin-related peptide (ppMTRLRP) which shares sequence similarities with prepromotilin. Mouse and rat ppMTRLRP sequences (rGhr) are identical and show 89% identity with human ghrelin (hGhr). By analogy with promotilin, cleavage of proMTRLRP into an 18 amino acid endogenous processed peptide can be assumed on the basis of a conserved dibasic motif in position 9–10 of its sequence. In the present work, we compared the GH-releasing activity of rGhr28/MTRLRP and of hGhr28/MTRLRP with that of a shorter form of the peptide, hGhr18. A short peptide devoid of Ser-3 n-octanoylation hGhr18[–] was also tested. Addition of rGhr28, hGhr28 and hGhr18 stimulated GH release to the same extent from superfused pituitaries. The effect was dose dependent in a 10^{-8} to 10^{-6} M concentration range. In contrast,

hGhr 18[–] was inactive. In freely moving animals, both rGhr28 and hGhr28 (10 μ g, i.v.) stimulated GH release, whereas the same dose of hGhr18 or of hGhr18[–] was ineffective. After rGhr28, GH plasma levels increased as early as 5 min after injection and returned to basal values within 40–60 min. Expressed as percent stimulation, administration of rGhr28 was equally effective when injected during troughs or peaks of GH. Plasma concentrations of prolactin, adrenocorticotropin and leptin were not modified. Spontaneous GH secretory episodes were no longer observed within 3 h of rGhr28 treatment, but repeated administration of the secretagogue at 3- to 4-hour intervals resulted in a similar GH response. Activation of somatostatin (SRIH) release by ether stress did not blunt the GH response to rGhr28. This suggests that the secretagogue acts in part by inhibiting endogenous SRIH, as further substantiated by the ability of rGhr28 (10^{-6} M), to decrease the amplitude of 25 mM K^+ -induced SRIH release from perfused hypothalami. In conclusion, (1) n-octanoylation of Ghrs and the shorter form hGhr18 is essential for the direct pituitary GH-releasing effect of this new family of endogenous GHSs; (2) only the longer forms are active in vivo and (3) inhibition of SRIH release appears involved in the mechanism of Ghr action.

Copyright © 2001 S. Karger AG, Basel

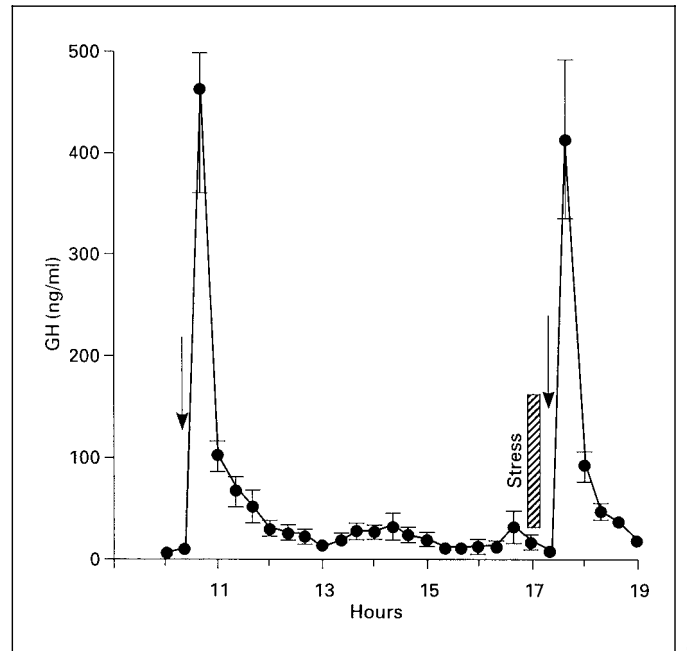
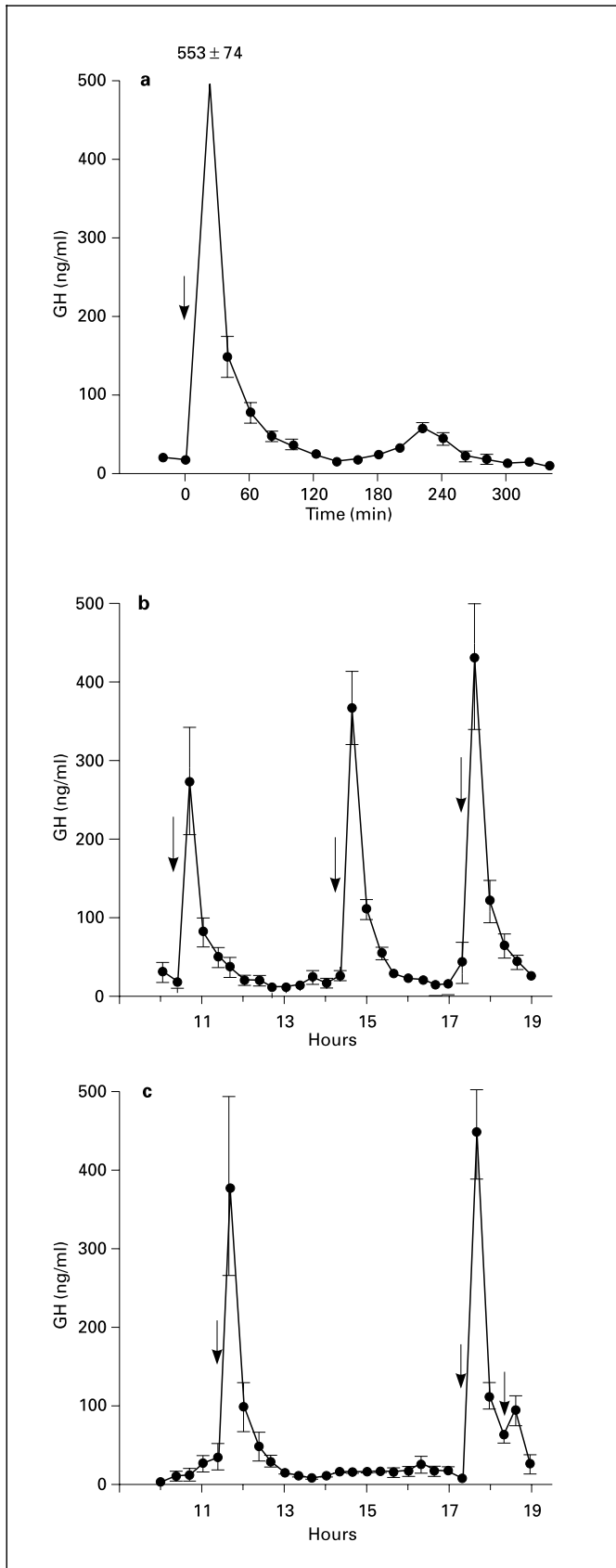
KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

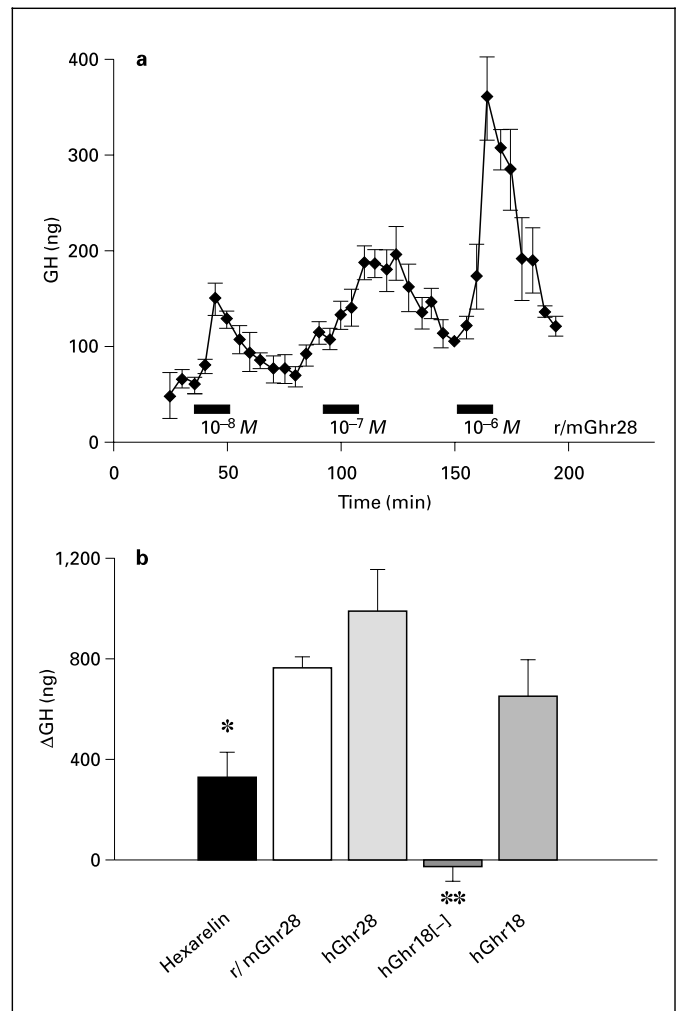
© 2001 S. Karger AG, Basel
0028-3835/01/0731-0054\$17.50/

Accessible online at:
www.karger.com/journals/nen

J. Epelbaum
2ter, rue d'Alésia
F-75014 Paris (France)
Tel. +33 1 40 78 92 32, Fax +33 1 45 80 72 93
E-Mail epelbaum@broca.inserm.fr



4



5

Introduction

Interactions between growth-hormone-releasing hormone (GHRH) and somatostatin (SRIH) hypophysiotropic neurons represent the final integrative pathway of GH pulsatile regulation. In addition, other factors, in particular GH secretagogues (GHSs), a new family of synthetic compounds [1], are also potent releasers of GH; they act via GHSs receptors [2] expressed both in the pituitary and the hypothalamus. An endogenous ligand specific for GHSs receptor, ghrelin (Ghr) [3], has recently been purified and characterized from the rat stomach.

A novel cDNA has also been isolated independently from entero-endocrine cells of the mouse stomach. It encodes a protein which has been named prepromotilin-related peptide (ppMTLRP) on the basis of its sequence similarities with prepromotilin [4]. As prepromotilin, ppMTLRP is processed into a secreted peptide and subsequently into an amino terminal motilin-related peptide (MTLRP) and a carboxy terminal MTLRP-associated peptide (MTLRPAP) [4]. The sequences of mouse ppMTLRP and of rat Ghr precursor (ppGhr) are identical and encoded by the same gene. In addition, cDNAs encoding the human homologs of ppMTLRP and ppGhr were isolated independently (accession Nos. AJ252278; AB029434) and found to be identical. The recently characterized rGhr itself corresponds to a 28 amino acid peptide n-octanoylated on serine 3 and shares 26 out of 28 amino acids with human Ghr (hGhr28) [3]. Although the precise cleavage site of proMTLRP has not been characterized yet, occurrence of an endogenous 18 amino acid MTLRP-processed peptide was inferred by analogy from the presence of a dibasic cleavage site in position 9–10 of promotilin [4].

The present study was designed in order to assess GH-releasing properties of synthetic peptides corresponding to the 1–28 or the 1–18 amino acid sequence of rodent and human Ghr/MTLRP (rGhr28, hGhr28 and hGhr18, respectively). The shorter form devoid of n-octanoic acid on Ser 3 (hGhr18[–]) was also tested. Experiments were performed both in vivo on freely moving rats and in vitro on perfused pituitaries. In vivo, activity of the peptides was monitored by measuring prolactin (PRL) and adrenocorticotropin (ACTH) secretion because of the reported pharmacological effects of GHSs [5]. Leptin secretion was also evaluated since it has recently been shown that Ghr28 stimulates feeding behavior in rodents [6]. Finally, interference of rGhr28 with SRIH release in vitro was also investigated on perfused hypothalamic explants.

Materials and Methods

Animals

Four weeks before experiments, adult male Sprague-Dawley rats weighing 125–150 g (Charles River, France) were housed individually in a room with controlled temperature (22–24°C) and illumination (12 h light/dark schedule with lights on at 13.00 h). They had free access to food and water and were regularly handled, in order to minimize stress effects, and weighed.

Drugs

HGhr28, hGhr18 and hGhr18[–] were synthesized on solid phase using Fmoc chemistry on a peptide synthesizer (431A, Applied Biosystems). Acetylation with n-octanoic acid was carried out as previously described [3]. rGhr28 was purchased from Neosystem (Strasbourg, France). Hexarelin synthesized by conventional solid phase synthesis was a gift of Europeptides (Argenteuil, France). The primary structure of these peptides is illustrated in figure 1. Immediately before use, peptides were either diluted in normal saline and injected intravenously in a volume of 0.3 ml, or diluted in the medium for in vitro experiments.

In vivo Experiments

Experiments were performed on freely moving rats implanted with an indwelling cannula inserted into the right atrium 2 days earlier under ether anesthesia, as previously described [7]. The distal extremity of the cannula was connected to a polyethylene catheter filled with 25 IU/ml heparinized saline 2 h before the beginning of sampling. Blood samples were withdrawn and centrifuged immediately, red blood cells resuspended in saline and reinjected every hour in order to attenuate hemodynamic modifications. Plasma was stored at –20°C until hormone assays.

In experiment 1, peptides (rGhr28, hGhr28, hGhr18[–] and hGhr18) or saline were administered intravenously at 10.20 h and serial blood samples withdrawn 20 min before, at time 0 and 20, 40 and 60 min after injection. In experiment 2, rats were divided into six groups. Blood was collected from 10.00 to 19.00 h every 20 min. Rats received a single injection of NaCl (group 1) or rGhr28 (10 µg/rat) at 10.20 h (group 2), 11.20 h (group 3), 12.20 h (group 4) or 13.20 h (group 5). After rGhr28 administration, additional samples were withdrawn after 5, 10, 20 and 30 min. In group 6, rGhr28 was injected twice at 10.20 and 17.20 h, and rats were submitted to a 10-min ether stress at 17.00 h. In experiment 3, rats received three injections of saline or rGhr28 (10 µg/rat) at either 10.20, 14.20 and 17.20 h or 11.20, 17.20 and 18.20 h. Plasma was collected every 20 min from 10.00 to 19.00 h.

In vitro Experiments

Animals were sacrificed by decapitation. Pituitaries and hypothalami were rapidly dissected, washed for 30 min in oxygenated Dulbecco's modified Eagle's medium (with L-glutamine, 4.5 g glucose L-1 and 25 mM HEPES) containing 0.1% bovine serum albumin, placed in perfusion chambers (vol 0.3 ml for pituitaries and 1 ml for hypothalami) and superfused at a rate of 0.1 ml/min with the same medium. After a 120-min equilibration period, effluents were collected every 5 min. Peptides were added to the medium during 20-min periods separated by perfusion with medium alone for 40 min. Samples were frozen until hormone determinations.

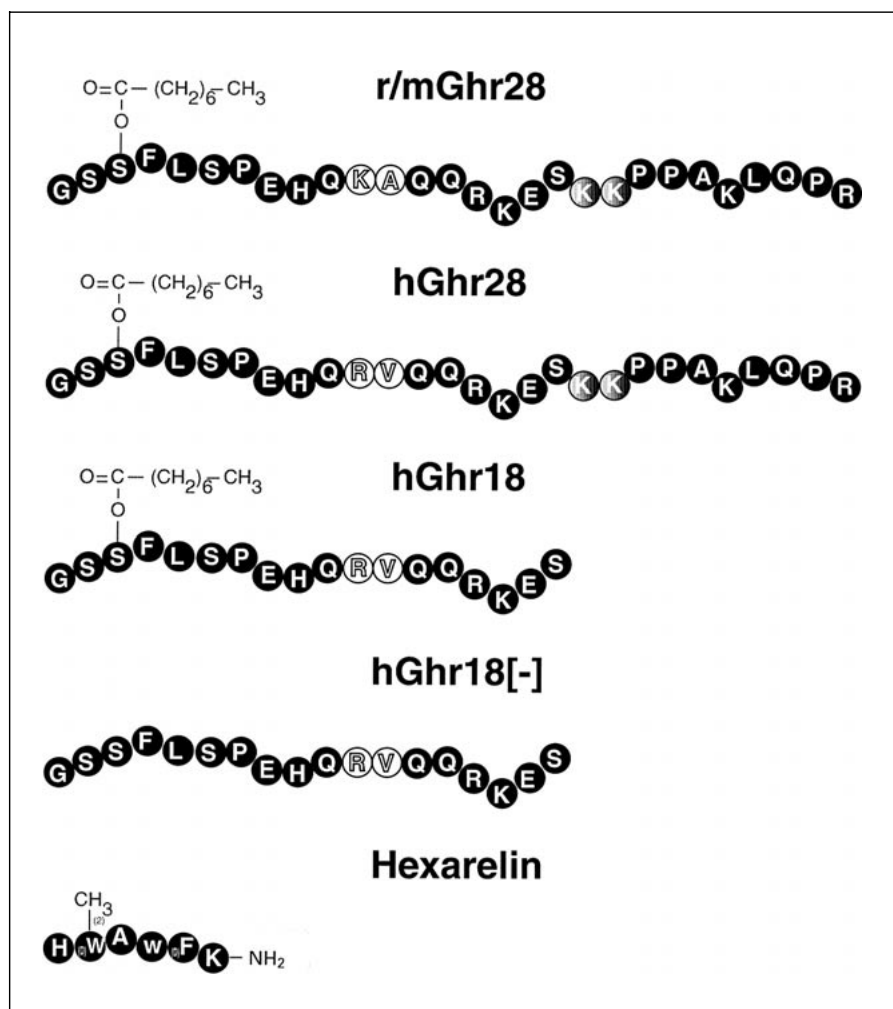


Fig. 1. Structures of rGhr28, hGhr28, hGhr18 and hGhr18[-]. Black amino acids indicate identity and white diversity in the sequence. Dibasic residues in rGhr28 and hGhr28 are in gray.

Table 1. Effect of rGhr28 (10 µg/rat) on plasma prolactin (PRL), ACTH and leptin levels in freely moving rats

Time (min)	-20	0	20	40	60
PRL (ng/ml)	5.9 ± 1.9	4.3 ± 1.5	6.8 ± 1.6	9.1 ± 2.0	7.3 ± 1.5
ACTH (pg/ml)	115 ± 17	135 ± 15	129 ± 20	103 ± 20	115 ± 18
Leptin (ng/ml)	1.7 ± 0.4	1.7 ± 0.4	1.6 ± 0.3	1.7 ± 0.4	1.8 ± 0.4

Values are mean ± SEM of 8 rats.

Hormone Assays

Plasma GH and PRL were measured by enzyme immunoassay as previously described [8, 9]. Sensitivity of the assays was 5 and 1 ng/ml, respectively, with intra- and interassay coefficients of variation below 7%. Values are referred to the rGH-RP2 and the rPRL-RP3 standards.

Plasma ACTH and leptin were determined using RIA kits (¹²⁵I-h-ACTH; ICN Biomedicals, Costa Mesa, Calif., USA, and ¹²⁵I-rat

leptin; WAK-Chemie Medical GmbH, Hamburg, Germany). Sensitivity was 25 pg/ml and 0.5 ng/ml, respectively, with intra- and inter-assay coefficients of variation below 10%.

SRIH was measured by RIA as previously described [10], using specific antisera kindly provided by C. Rougeot (Institut Pasteur, Paris, France). The detection limit was 20 pg/ml, and intra- and interassay coefficients of variation were below 12%.

Statistical Analysis

GH pulse analysis was performed using the Cluster program [11] setting the *t* value to 2 in order to maintain a false-positive rate under 1%. Cluster size was set to 2 pre-peak and 2 post-peak nadir values. False-positive error for peak detection was 7%. Areas under curves (AUC) were calculated by mean of trapezoidal analysis and expressed in arbitrary units. Statistical evaluation was performed by analysis of variance using the statview 4.5 software (Abacus concept, Palo Alto, Calif., USA).

Results

In vivo Experiments

Both rGhr28 and hGhr28 (10 µg, i.v.) stimulated GH release in freely moving animals. In contrast, the shorter forms tested at the same dose were ineffective, whether they included hGhr18 or did not include (hGhr18[-]) an n-octanoyl chain (AUC) during the 60-min period following administration: 7,933 ± 1,715 (n = 14) and 7,988 ± 1,708 (n = 5) for rGhr28 and hGhr28 versus 1,657 ± 327 (n = 12) for NaCl and 1,422 ± 279 (n = 9) and 990 ± 191 (n = 5) for hGhr18[-] and hGhr18, respectively; *p* < 0.001 between rGhr28 and hGhr28 versus NaCl.

Intravenous administration of rGhr28 (10 µg, i.v.) increased plasma GH levels as early as 5 min after the injection (fig. 2). The effect was maximal at 10 min, and return to basal values occurred after 40 to 60 min. Under the same conditions, rGhr28 had no effect on plasma PRL, ACTH and leptin concentrations (table 1).

Administration of rGhr28 resulted in a significant GH stimulation, whether performed during a trough (10.20 and 12.20 h; fig. 2a) or a peak period (11.20 and 13.20 h; fig. 2b). Although the amplitude of the GH response was more important in absolute terms during peak periods, it was comparable to that recorded during troughs when expressed as percent of preinjection values (692 ± 88% increase during troughs versus 600 ± 50% during peak periods).

Spontaneous GH secretory episodes were never observed within 3 h following rGhr28-evoked GH stimulation (fig. 3a; mean interval between rGhr28-evoked and the next spontaneous GH secretory episode calculated by cluster analysis: 194 ± 13 min). Repeated administration of rGhr28-stimulated GH release to a comparable extent when performed at 3- to 4-hour intervals (10.20, 14.20 and 17.20 h; fig. 3b), but not at shorter (1-hour) intervals (fig. 3c).

Within 10 min of exposure to ether anesthesia, that is under stressful conditions known to stimulate release of SRIH, the amplitude of GH release induced by rGhr28

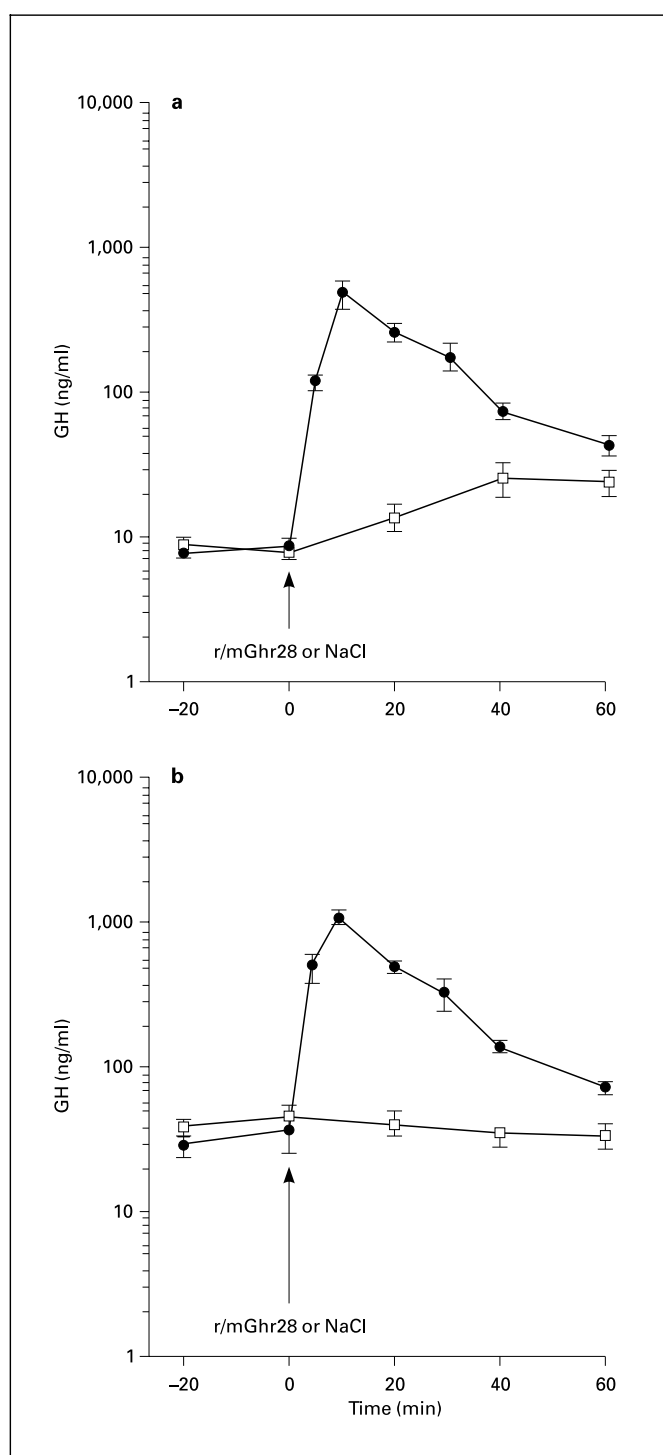
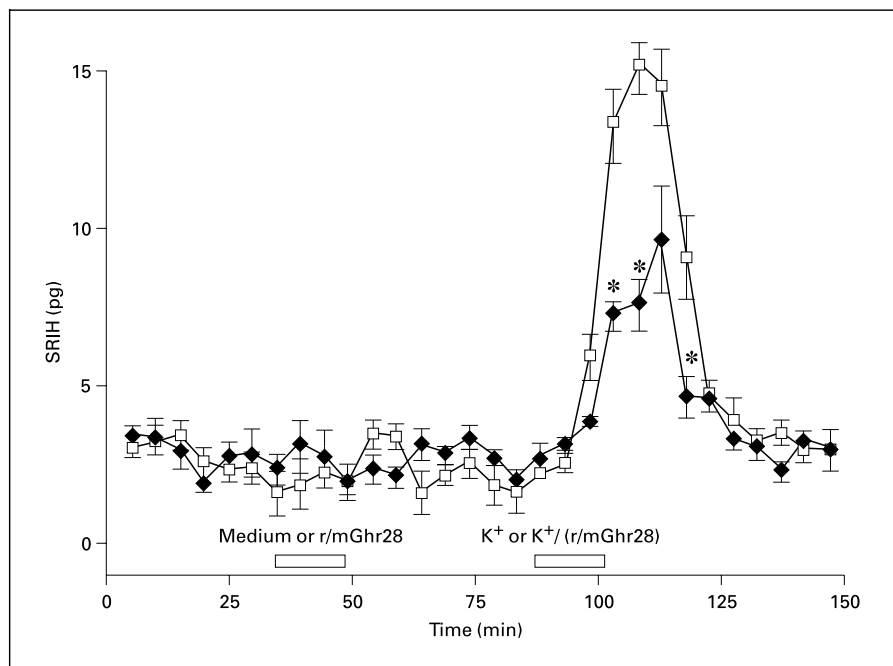


Fig. 2. Effect of rGhr28 (10 µg/rat; closed circles) or NaCl (open squares) on plasma GH levels in trough (a) or in peak periods (b). Data are means ± SEM of 10 rats. Arrows indicate the time of the injections.

Fig. 6. Effect of r/mGhr28 (10^{-6} M; closed symbols) on basal and 25 mM K^+ -stimulated release of SRIH from perfused hypothalamus (medium only; open squares). Data are given as pg/n sample. The volume of each sample is 500 μ l. Each point and vertical bar indicates means \pm SEM of 5 chambers. * $p < 0.05$, versus K^+ alone.



was comparable to that obtained in unanesthetized animals (fig. 4).

In vitro Experiments

Addition of rGhr28 to the medium stimulated GH release from superfused pituitaries in a dose-dependent manner (Δ GH: 238 ± 17 , 347 ± 56 and 766 ± 51 ng for rGhr28 concentrations of 10^{-8} , 10^{-7} and 10^{-6} M, respectively; fig. 5a). GH responses to rGhr28, hGhr28 or the

shorter hGhr18 peptide were comparable (fig. 5b). A micromolar concentration of hexarelin, a synthetic GH-releasing peptide acting on GHS receptors, also elicited an effect of the same magnitude as rGhr28 when applied at 10^{-7} M (Δ GH = 326 ± 93 ng; fig. 5b). In contrast, the nonoctanoylated form hGhr28[-] was ineffective on GH release in vitro.

When tested on perfused hypothalamic tissue, rGhr28 (10^{-6} M) significantly inhibited release of SRIH induced by 25 mM K^+ depolarization (fig. 6). In contrast, basal SRIH release was not affected under the same conditions.

Fig. 3. Effect of different schedules of rGhr28 (10 μ g) administration on GH release in rats. **a** Mean profile of GH release after a single rGhr28 injection ($n = 12$). **b** Mean profile of GH release after three rGhr28 injections separated by 240 (1–2) or 180 min (2–3; $n = 10$). **c** Mean profile of GH release after three rGhr28 injections separated by 360 (1–2) or 60 min (2–3; $n = 5$). Arrows indicate the time of the injections.

Fig. 4. Effect of rGhr28 after stress-induced inhibition of GH secretion. Rats were submitted to an ether stress from 17.00 to 17.10 h. Values represent the mean \pm SEM of 5 rats.

Fig. 5. Effect of hexarelin, rGhr28, hGhr28, hGhr18[-] and hGhr18 on GH release from superfused pituitaries. **a** Mean profile of GH release after increasing doses of rGhr28. Data are given as ng/sample. The volume of each sample is 500 μ l. **b** Effect of hexarelin, rGhr28, hGhr28, hGhr18[-] and hGhr18 (10^{-6} M). Data are expressed as the sum of GH released during 30 min after the beginning of peptide infusion minus basal release for an equivalent time period. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$, versus rGhr28. Each point and vertical bar represents the mean \pm SEM of 4 chambers.

Discussion

Our results indicate that rGhr28, hGhr28 and hGhr18 are equally potent to stimulate GH secretion in vitro. This suggests that the first 18 amino acids of the Ghr sequence are sufficient for full expression of its activity on somatotropes. In addition, our data confirm that n-octanoylation of the Ser-3 is a prerequisite to the GH-releasing activity of Ghrs on the pituitary [3], and indicate that the octanoyl chain is equally required in the case of the shorter Ghr18 form.

Interestingly, and in contrast to its direct effect on somatotropes in vitro, the shorter hGhr18 sequence is no longer able to stimulate GH secretion in vivo. Ineffective-

ness of hGhr18 may be due to several factors. It could be accounted for by a lesser capacity of the peptide to cross the blood-brain barrier, a process which seems to require the 10 amino acid terminal sequence of the peptide. In that case, the shorter peptide would act on the pituitary, but not on the hypothalamus, which seems to contribute much more to the overall effect than direct Ghr actions on the pituitary (the dose of 10 µg/rat injected *in vivo* corresponds to an average dilution of approximately 10^{-7} M in the extracellular space, a concentration which increases GH release only twofold *in vitro*, but 20- to 50-fold *in vivo*). A similar process has recently been hypothesized to explain why synthetic GHSs are more effective when administered intracerebroventricularly rather than intravenously [12, 13]. Alternately, the short and long forms could act via different receptors. A pituitary receptor subtype apparently distinct from the cloned GHS receptor has recently been described [14]. It is also of interest to note that GHS [2] and motilin [15] receptors belong to the same protein family, sharing 52% identity. Finally, we cannot exclude a rapid degradation of the shorter peptide in blood. Studies on the structure activity of motilin have shown that the biological activity of the molecule resides in the first 7 amino acids, while the C-terminal α -helical structure is important to provide protection of the molecule against enzymatic degradation that could occur when injected intravenously [16, 17]. Alternately, the 10 amino acid C-terminal sequence might also be necessary to induce a Ghr configuration able to cross the blood-brain barrier.

The effect of rGhr28 is both rapid and transient, since GH values peak 10 min after injection and return to basal levels after 40–60 min only. In addition, the effect is specific for GH, since PRL and ACTH are not stimulated. This contrasts with a few clinical studies reporting a slight, but significant stimulation of PRL and ACTH by different GHS. Most studies, however, show that GHS are relatively specific for GH release in rats [1, 5]. Our data indicate that rGhr28 does not affect plasma leptin either, although a feeding episode was consistently observed within 5 min of rGhr28 injection (data not shown), in keeping with a recent report of Tschöp et al. [6].

A single intravenous injection of rGhr28 to unanesthetized rats proved effective on GH release, whether performed during troughs or peaks of spontaneous pulsatile GH secretion. In absolute terms, the amplitude of the GH response was greater during peak periods; however, when expressed as percent of preinjection levels, maximal stimulation was identical in both cases. This contrasts with the GH response to GHRH, which is only able to markedly trigger GH release when injected during peak periods

[18]. This suggests that rGhr28 is able to potentiate the action or secretion of GHRH as previously described for GHRP6 [19, 20] and/or to inhibit SRIH release or its effects. At the hypothalamic level, the expression of GHS-R on GHRH [21] and/or NPY [22] arcuate neurons is consistent with an effect of GHS on these neurons and could account for that synergy. The SRIH-inhibiting effect is further substantiated by our observation that rGhr28 was also able to release GH in ether anesthetized animals, a condition under which the SRIH inhibitory tone over GH secretion is also increased, while the GH response to GHRH is blunted. Interference of SRIH with GHS on GH release is also indicated by observations that responses to GHRP6 or hexarelin are increased in anesthetized [23], but not in freely moving rats [24] after pretreatment with SRIH antisera.

In order to further test this hypothesis, SRIH release from perfused hypothalamic fragments was monitored under basal or K^+ -depolarization-stimulated conditions. Addition of rGhr28 resulted in inhibition of K^+ -stimulated, but not basal SRIH release. This inhibitory effect was not observed when synthetic GHS were applied in a static incubation model [25], a discrepancy probably related to the necessity to use perfusion systems in order to monitor rapid effects on neuronal release. Blockade of K^+ -induced SRIH release by rGhr28 lends additional support to the contention that, unlike GHRH, rGhr28 has a dual action at the hypothalamic level, by modulating the release of GHRH and of SRIH in an opposite manner.

Spontaneous GH secretory episodes were never observed within 3 h of rGhr28-stimulated GH release. This may be due to the negative feedback effect of GH over its own secretion, as evidenced by the capacity of GH administration to inhibit pulsatile secretion of endogenous GH for durations of 3–4 h [26]. We have previously shown that this negative feedback involves direct activation of SRIH neurons via hypothalamic GH receptors [27].

Finally, repeated administration of rGhr28 at 3- or 4-hour intervals does not induce desensitization. Similar results have already been described with two GHS, GHRP6 and L 692,585 [12]. In contrast, a second injection of rGhr28 given within 1 h of the first elicits a minimal GH response only. Such desensitization can be due to decreased numbers of available GHS receptors on either pituitary somatotropes or hypothalamic neurons, and/or to depletion of readily releasable pituitary GH stores. It should not involve increased somatostatin inhibition due to the GH feedback, since, as stated previously, rGhr28 is able to stimulate GH even under conditions of elevated SRIH tone.

In summary, the present results indicate that (1) n-octanoylation of Ghr28 or hGhr18 is essential for the direct pituitary releasing effect of these peptides; (2) only Ghr28 is active in vivo, and (3) inhibition of SRIH release or pituitary impact appears involved in the mechanism of action of Ghr28. It remains to be determined whether other neuropeptides, such as GHRH or NPY, are also involved in the hypothalamic action of Ghr28, and why the shorter peptide hGhr18 is only active in vitro at the pituitary level.

Acknowledgments

We thank P. Eberling for technical assistance. This work was supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue Nationale Française contre le Cancer and the Comités du Haut-Rhin et du Bas-Rhin, and the Fondation de France.

References

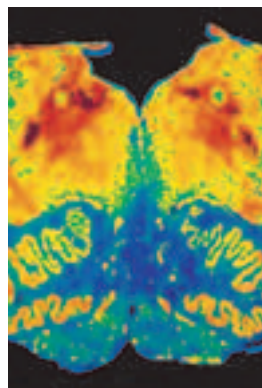
- Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ, Wyvratt MJ Jr, Fisher MH, Nargund RP, Patchett AA: Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 1997;18:621–645.
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevicz M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJS, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, De Martino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van Der Ploeg LHT: A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996;273:974–977.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656–660.
- Tomasetto C, Karam SM, Ribieras S, Masson R, Lefebvre O, Staub A, Alexander G, Chenard MP, Rio MC: Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: The motilin-related peptide. *Gastroenterology* 2000;119:395–405.
- Ghigo E, Arvat E, Muccioli G, Camanni F: Growth hormone-releasing peptides. *Eur J Endocrinol* 1997;136:445–460.
- Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML: Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000;407:908–913.
- Bluet-Pajot MT, Durand D, Drouva SV, Mounier F, Pressac M, Kordon C: Further evidence that thyrotropin-releasing hormone participates in the regulation of growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 1986;44:70–75.
- Ezan E, Laplante E, Bluet-Pajot MT, Mounier F, Mamas S, Grouselle D, Grognet JM, Kordon C: An enzyme immunoassay for rat growth hormone: Validation and application to the determination of plasma levels and in vitro release. *J Immunoassay* 1997;18:335–356.
- Duhau L, Grassi J, Grouselle D, Enjalbert A, Grognet JM: An enzyme immunoassay for rat prolactin: Application to the determination of plasma levels. *J Immunoassay* 1991;12:233–250.
- Rorstad OP, Epelbaum J, Brazeau P, Martin JB: Chromatographic and biological properties of immunoreactive somatostatin in hypothalamic and extrahypothalamic brain regions of the rat. *Endocrinology* 1979;105:1083–1092.
- Veldhuis JD, Carlson ML, Johnson ML: The pituitary gland secretes in bursts: Appraising the nature of glandular secretory impulses by simultaneous multiple-parameter deconvolution of plasma hormone concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7686–7690.
- Fairhall KM, Mynett A, Smith RG, Robinson ICAF: Consistent GH responses to repeated injections of GH-releasing hexapeptide (GHRP-6) and the non-peptide GH secretagogue, L-692,585. *J Endocrinol* 1995;145:417–426.
- Dickson SL, Doutrelant-Viltart O, Dyball RE, Leng G: Retrogradely labelled neurosecretory neurones of the rat hypothalamic arcuate nucleus express Fos protein following systemic injection of GH-releasing peptide-6. *J Endocrinol* 1996;151:323–331.
- Ong H, McNicoll N, Escher E, Collu R, Deghenghi R, Locatelli V, Ghigo E, Muccioli G, Boghen M, Nilsson M: Identification of a pituitary growth hormone-releasing peptide (GHRP) receptor subtype by photoaffinity labeling. *Endocrinology* 1998;139:432–435.
- Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Palyha OC, Hreniuk DL, Pong SS, 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, Evans J, Patchett AA, Smith RG, Howard AD: Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system. *Science* 1999;284:2184–2188.
- Miller P, Gagnon D, Dickner M, Aubin P, St-Pierre S, Poitras P: Structure-function studies of motilin analogues. *Peptides* 1995;16:11–18.
- Raymond MC, Boivin M, St-Pierre S, Gagnon D, Poitras P: Studies on the structure-activity of motilin in vivo. Effect of motilin synthetic analogues in conscious dog. *Regul Pept* 1994;50:121–126.
- Tannenbaum GS, Ling N: The interrelationships of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology* 1984;115:1952–1957.
- Bowers CY, Reynolds GA, Durham D, Barrera CM, Pezzoli SS, Thorner MO: Growth hormone (GH)-releasing peptide stimulates GH release in normal men and acts synergistically with GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:975–982.
- Cordido F, Penalva A, Dieguez C, Casanueva FF: Massive growth hormone (GH) discharge in obese subjects after the combined administration of GH-releasing hormone and GHRP-6: Evidence for a marked somatotroph secretory capability in obesity (see comments). *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:819–823.
- Tannenbaum GS, Lapointe M, Beaudet A, Howard AD: Expression of growth hormone secretagogue-receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 1998;139:4420–4423.
- Willesen MG, Kristensen P, Romer J: Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 1999;70:306–316.
- Bowers CY, Sartor AO, Reynolds GA, Badger TM: On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP. *Endocrinology* 1991;128:2027–2035.
- Conley LK, Teik JA, Deghenghi R, Imbimbo BP, Giustina A, Locatelli V, Wehrenberg WB: Mechanism of action of hexarelin and GHRP-6: Analysis of the involvement of GHRH and somatostatin in the rat. *Neuroendocrinology* 1995;61:44–50.
- Korbonits M, Little JA, Forsling ML, Tringali G, Costa A, Navarra P, Trainer PJ, Grossman AB: The effect of growth hormone secretagogues and neuropeptide Y on hypothalamic hormone release from acute rat hypothalamic explants. *J Neuroendocrinol* 1999;11:521–528.
- Lanzi R, Tannenbaum GS: Time course and mechanism of growth hormone's negative feedback effect on its own spontaneous release. *Endocrinology* 1992;130:780–788.
- Pellegrini E, Bluet-Pajot MT, Mounier F, Bennett P, Kordon C, Epelbaum J: Central administration of a growth hormone (GH) receptor mRNA antisense increases GH pulsatility and decreases hypothalamic somatostatin expression in rats. *J Neurosci* 1996;16:8140–8148.

Bluet-Pajot MT, Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, Grouselle D, Epelbaum J. Ghrelin: a striking example of neuroendocrine peptide pleiotropy. *Med Sci (Paris)* 2005 Aug-Sep;21(8-9):715-21.

> La ghréline, peptide essentiellement produit par l'estomac endocrine, a été découverte en tant que ligand naturel du récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance (GH). Très rapidement, elle s'est révélée être le premier facteur orexigène périphérique. À côté de cette fonction, la ghréline influence de nombreuses voies neuroendocriniennes, métaboliques et extraendocriniennes, notamment au sein du système cardiovasculaire. La liaison de la ghréline au récepteur des sécrétagogues de GH de type 1a (GHS-R 1a) nécessite la présence, sur le peptide, d'une acylation de la sérine située en position 3. Si cette modification est indispensable pour la stimulation de la GH et pour certains effets métaboliques, elle n'est pas requise pour les autres fonctions du peptide, dans lesquelles d'autres récepteurs sont probablement impliqués. Les souris invalidées pour le gène de la préproghréline ne sont ni anorexiques, ni naines. En revanche, les souris *GHS-R*^{-/-} sont légèrement moins lourdes, et les actions GH-sécrétagogue et orexigène de la ghréline sont neutralisées chez ces animaux. Ainsi, l'histoire fascinante de la ghréline et ses implications physiopathologiques potentielles en endocrinologie et en médecine interne sont encore en devenir. <

La ghréline, un exemple saisissant de pléiotropie des peptides neuroendocriniens

Marie-Thérèse Bluet-Pajot, Virginie Tolle, Philippe Zizzari, Catherine Tomasetto, Dominique Grouselle, Jacques Epelbaum



M.T. Bluet-Pajot, P. Zizzari, J. Epelbaum, D. Grouselle, V. Tolle : IFR Broca-Sainte-Anne, Inserm U.549, 2 ter, rue d'Alésia, 75014 Paris, France.

C. Tomasetto : Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC), CNRS/Inserm U.184/ULP, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, France.

Virginie Tolle : Vollum Institute, Department of behavioral neuroscience, and Center for the Study of weight regulation and associated disorders, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon, États-Unis. epelbaum@broca.inserm.fr

Dphe-LysNH₂), première molécule active *in vitro* et *in vivo*. Après la mise en évidence de la GHRH (*growth hormone releasing hormone*), neurohormone hypothalamique directement responsable de la sécrétion de GH hypophysaire, les GHS sont cependant considérés comme une curiosité pharmacologique sans pertinence physiologique.

Ce n'est qu'au début des années 90, lorsque des effets bénéfiques d'un traitement par la GH recombinante sont observés chez les personnes âgées (diminution de la masse grasse, augmentation de la masse maigre, amélioration du bien-être...), que l'industrie pharmaceutique s'intéresse de plus près aux GHS. Merck emploie une stratégie de pharmacologie inverse en déterminant le système de transduction utilisé par le GHRP-6, qui se révèle rapidement être la mobilisation du calcium intracellulaire ([Ca²⁺]_i) par l'intermédiaire d'une protéine Gq. En trois ans, des peptidomimétiques sont développés, faisant passer l'affinité des composés du micromolaire au nanomolaire, avec une biodisponibilité et une demi-vie permettant les études chez

L'histoire de la ghréline (de la racine sanscrite ghr : croissance) commence vingt-trois ans avant sa découverte en tant que ligand naturel du récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance (GH) à partir d'extraits d'estomac de rat, fin 1999 [1]. En effet, c'est en 1976 que Cyril Bowers, en recherchant des agonistes opiacés, observe qu'un dérivé de la met-enképhaline, le Tyr-DTrp-Gly-Gly-Phe-MetNH₂, stimule la sécrétion de GH *in vitro*, alors qu'il ne présente plus d'activité opiacée [2] (Figure 1). La découverte de ce premier sécrétagogue de la GH (GHS) est suivie, en 1984, par celle du GH-releasing peptide-6 (GHRP-6, His-DTrp-Ala-Trp-

Article reçu le 19 janvier 2005, accepté le 18 mars 2005.

l'homme. Une spiropéridine, le MK 0677 (Figure 1), entraîne en administration orale chronique une « jouvence » de l'axe somatotrope chez la personne âgée [3]. Après radiomarquage, cette même molécule permet la mise en évidence de récepteurs au niveau de l'antéhypophyse et de l'hypothalamus. L'expression infime du récepteur nécessite alors un clonage par expression, qui aboutit en 1996 à la découverte d'un récepteur orphelin, couplé à une protéine Gq, baptisé GHS-R [4]. Ayant cloné le récepteur, la découverte du ligand endogène paraît à portée de main. Effectivement, on découvre que l'adénosine hypothalamique est un ligand endogène du récepteur [5] ; toutefois, elle ne stimule pas la sécrétion de GH. C'est un groupe japonais qui, à partir des homologies de séquence entre le GHS-R et le récepteur de la motiline, un peptide gastro-intestinal, entreprend une approche systématique d'extraction et de purification de peptides, de l'œsophage jusqu'au colon, afin d'évaluer la capacité des extraits acides bouillis à stimuler le $[Ca^{2+}]_i$ de cellules surexprimant le GHS-R. Un extrait d'estomac correspondant à un peptide de 28 acides aminés est ainsi sélectionné, mais le peptide synthétique se révèle inactif. Cependant, le temps de rétention de l'extrait naturel en RP-HPLC est légèrement plus long que celui du peptide synthétique, et la spectrométrie de masse de la ghréline purifiée donne une masse moléculaire de 3315, contre 3189 au peptide synthétique de 28 acides aminés. Ce peptide montre d'ailleurs des homologies de séquences si fortes avec la

motiline qu'il est indépendamment dénommé *motilin-like related-peptide* [6]. Les chimistes japonais pensent alors que la modification la plus probable pour expliquer une différence de masse de 144 est l'addition d'un acide gras, l'acide n-octanoïque, sur la sérine en position 3. Le peptide de 28 acides aminés, octanoylé sur la sérine en position 3, est synthétisé et se révèle parfaitement bioactif : la quête pour la ghréline est terminée, mais non les surprises...

Combien de ligands et de récepteurs ?

Chez l'homme, le gène de la préproghréline est localisé sur le chromosome 3, en 3p25-26. Quatre exons et trois introns ont été décrits en position 141 (2 000 bp intron), 258 (3 000 bp intron) et 367 (800 bp intron) d'un ADNc de 511 bp. Cet ADNc code pour une protéine de 117 acides aminés, ayant un peptide signal de 23 acides aminés et une forme proghréline de 94 acides aminés, dont les 28 premiers constituent, après un processus d'acylation sur la sérine en position 3, la ghréline (Figure 1). Les quatre ou cinq premiers acides aminés, essentiels pour activer la mobilisation du $[Ca^{2+}]_i$ par le GHS-R 1a, sont conservés au cours de l'évolution [7]. Un variant d'épissage, aboutissant à la synthèse d'un peptide mature ghréline de 27 acides aminés dépourvu d'un résidu glutamine en position 14, possède les mêmes propriétés que le peptide de 28 acides aminés.

Le gène codant pour le récepteur GHS-R est également situé sur le chromosome 3, en 3q26.2. Il code pour un récepteur à sept domaines transmembranaires de 366 acides aminés, le GHS-R 1a (Figure 1). Un variant d'épissage a été décrit, codant pour une protéine de 289 acides aminés à cinq domaines transmembranaires, mais l'existence de cette protéine, nommée GHS-R 1b, n'a jamais été démontrée *in vivo*. Dans des lignées transfectées, le type 1b ne lie pas le MK 0677 et ne présente pas d'activité biologique de libération de GH ou de mobilisation du $[Ca^{2+}]_i$.

La ghréline et les GHS augmentent le $[Ca^{2+}]_i$ et le métabolisme des inositols phosphates. Lorsqu'il est transfecté, le GHS-R 1a est constitutivement actif [8] : la mesure du métabolisme des IP3 montre en effet que, en l'absence d'agoniste, le récepteur présente déjà 50 % de son activité. Deux ligands endogènes putatifs ont été décrits (Tableau 1) : l'adénosine est un agoniste partiel, moins puissant que les GHS sur la mobilisation du $[Ca^{2+}]_i$ et inactif sur la libération de GH [5] ; la cortistatine, un peptide cérébral apparenté à la somatostatine, se lie quant à elle aux sites de liaison hypophysaires de la ghréline et atténue ses effets sur la GH. Cependant, il est probable que cet effet passe également par les récepteurs de la somatostatine [9].

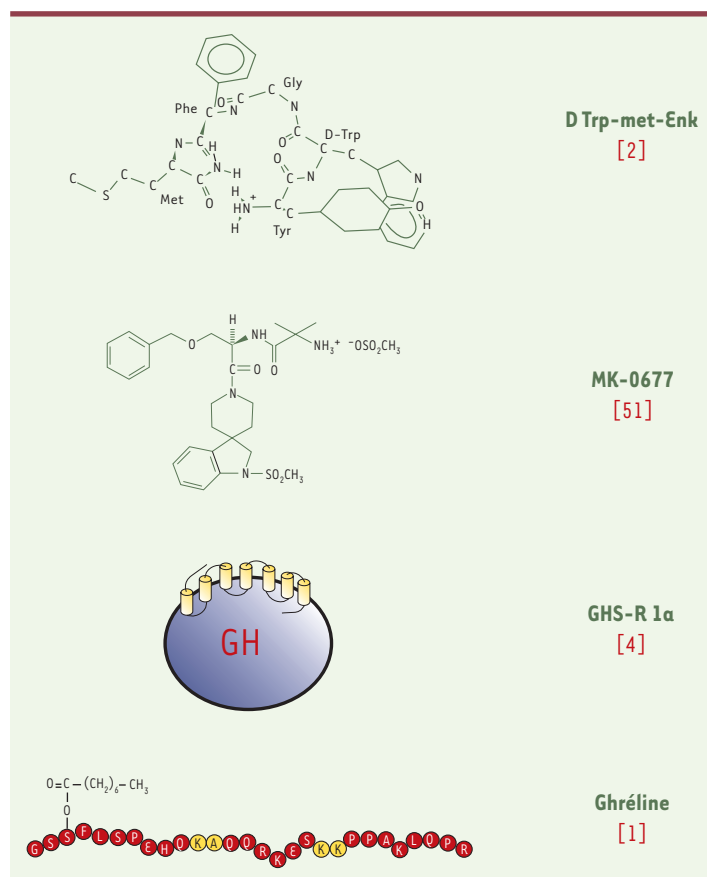


Figure 1. Ghréline et autres sécrétagogues de la GH (GHS), et leur récepteur GHS-R 1a.

Le récepteur GHS-R 1a ne rend pas compte de tous les sites de liaison de la ghréline ou des GHS. Dans le plasma, la ghréline se lie à un complexe lipoprotéique comprenant la clusterine (apolipoprotéine J) et la paraoxonase [10]. Cette estérase clive les lipides oxydés en LDL, et une faible activité paraoxonase est liée à la maladie coronarienne. Cette enzyme aurait donc pu être impliquée dans les mécanismes de désacylation de la ghréline : il ne semble pas que ce soit le cas [11]. L'hexaréline, mais pas le MK 0677 ni la ghréline, se fixe avec une affinité raisonnable au CD36, un récepteur d'épuration multifonctionnel [12]. Enfin, le (ou les) récepteur(s) relayant les effets de la ghréline non acylée reste(ent) totalement inconnus...

Effets neuroendocriniens et métaboliques

La ghréline augmente non seulement la sécrétion de GH, mais également, et rapidement, celle de l'ACTH (hormone adrénocorticotrope), du cortisol et de la prolactine [13]. Un traitement aigu par la ghréline ou par des GHS synthétiques stimule également la prise alimentaire [14]. Si la ghréline est essentiellement synthétisée par les cellules endocrines de l'estomac, l'existence d'un système neuronal intrahypothalamique [15] reste encore débattue [16]. Il est admis que la ghréline agit majoritairement par l'intermédiaire de

récepteurs intrahypothalamiques exprimés par les neurones à GHRH [17], pour stimuler la libération de GH et, de manière indépendante, sur les neurones à neuropeptide Y/AgRP (*Agouti-related protein*), pour augmenter la prise alimentaire [18]. Cependant, elle agit aussi directement au niveau hypophysaire sur la sécrétion de GH [19]. La sécrétion gastrique et le complexe dorsovagal sont également impliqués [20]. Le récepteur de la ghréline est synthétisé dans les neurones vagues et transporté aux terminaisons afférentes ; si la ghréline est administrée à des rats vagotomisés, elle ne stimule plus l'appétit et son effet sur la GH est considérablement diminué.

La régulation de l'appétit et de la prise de poids est un phénomène très complexe. Sur la base des effets du peptide administré de façon exogène, la ghréline apparaissait comme un régulateur important de la prise alimentaire et de la sécrétion de GH à court terme et, par conséquent, du poids corporel. Étant donné ses effets sur la GH, hormone lipolytique, on aurait pu s'attendre à une diminution de la masse grasse ; or la ghréline, en traitement chronique, augmente l'adiposité [21], et ce indépendamment d'une augmentation de la prise alimentaire, cet effet étant observé chez des animaux disposant d'une quantité limitée de nourriture. Par ailleurs, un traitement chronique par la ghréline entraîne un accroissement du quotient respiratoire, ce qui suggère une augmentation de l'ingestion des carbohydrates ou une diminution de celle des lipides, avec augmentation subséquente de leur stockage. Ce paradoxe semble en partie résolu : l'effet adipogène de la ghréline pourrait impliquer les formes non octanoylées du peptide, avec action directe sur les adipocytes par l'intermédiaire d'un récepteur distinct du GHS-R 1a [22]. L'importance du rôle orexigène et adipogène de la ghréline a cepen-

dant été remise en cause par les résultats obtenus sur des souris invalidées pour le gène de la préproghréline qui, en première analyse, ne présentent aucun phénotype particulier en termes de croissance ou d'appétit [23] : les souris *ghréline*^{-/-} s'ajoutent ainsi à la liste des animaux qui, invalidés pour différents gènes de facteurs orexigènes (NPY, AgRP), ne montrent aucun phénotype majeur, notamment en comparaison des souris déficientes pour les gènes de facteurs anorexigènes (MCH-melanin concentrating hormone, leptine, mélanocortine) et de leurs récepteurs. En revanche, les souris invalidées pour le gène du récepteur GHS-R ne répondent plus ni à la ghréline, ni au MK 0677 en termes de sécrétion de GH ou de prise alimentaire

Récepteurs	Ligands naturels	Ligands synthétiques	
		Agonistes	Antagonistes
GHS-R 1a	Ghréline, adénosine (agoniste partiel), cortistatine	GHRP6 Hexaréline MK 0677 Pseudomoréline (EP51389) TZP 101 TH 2306.34 (5 AA, boucle extracellulaire du GHS-R 1a, agoniste non compétitif) BIM 28131	D-Lys3-GHRP6 BIM 28163 NOX B11
GHS-R 1b	Aucun		
CD36	Aucun	GHRP6 Hexaréline	
Inconnu	Ghréline non acylée		

Tableau 1. Récepteurs et ligands. L'adénosine ne stimule pas la sécrétion de GH, la cortistatine atténue les effets de la ghréline. EP 51389 et TH 2306.34 stimulent la sécrétion de GH, BIM 28131 augmente la prise de poids, TZP 101 stimule la vidange gastrique. BIM 28163 inhibe l'effet de la ghréline sur la GH, mais augmente la prise de poids (il agit donc également par l'intermédiaire d'un autre récepteur). L'hexaréline, via CD36, prévient la formation d'athérosclérose.

[24]; de plus, leur poids corporel est légèrement inférieur dès 16 semaines, et la concentration en IGF-1 (*insulin-like growth factor*) plus basse (-21 %) à 24 semaines [16]. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que l'absence de ghréline est compensée durant l'embryogenèse. Aucune donnée concernant les autres rôles de la ghréline, sur la motricité gastro-intestinale ou la sphère cardiovasculaire, n'a été rapportée dans ces modèles (Tableau II).

Effets gastro-intestinaux

Étant donné sa localisation dans les cellules A de l'estomac, il n'est pas surprenant que la ghréline agisse sur la sécrétion acide gastrique et la motricité. Ces effets sont abolis lors d'un traitement par l'atropine et par une vagotomie bilatérale, mais pas par des antagonistes H2 [25]. L'activité motrice sur le tractus gastro-intestinal passe en partie par les neurones à NPY et le nerf vague, mais il existe un effet direct analogue à celui de la motiline [26]. En revanche, la ghréline, mais pas la motiline, est capable de contrecarrer l'ileus gastrique postopératoire [27]. Elle protège également de l'ulcère gastrique induit par l'éthanol [28]. L'infection par *Helicobacter pylori* n'affecte pas les concentrations circulantes de ghréline, mais son éradication s'accompagne d'une augmentation de l'expression du peptide, ce qui pourrait expliquer l'augmentation d'appétit et la reprise de poids observées dans ces conditions [29]. Au niveau du pancréas exocrine, la ghréline est un puissant inhibiteur de la sécrétion d'amylase, par un mécanisme indirect impliquant probablement des neurones intrapancréatiques [30]. Elle augmente les concentrations sanguines de peptides gastro-intestinaux, comme la somatostatine ou le polypeptide pancréatique, sans modifier les niveaux de gastrine [31]. Enfin, elle inhibe la sécrétion d'insuline, par un mécanisme qui pourrait faire intervenir sa forme non acylée [32].

Effets cardiovasculaires

Le rôle cardioprotecteur de la GH et de l'IGF-1 étant bien établi, il paraissait logique d'évaluer les effets des sécrétagogues de la GH (GHS) sur la fonction cardiaque. Des effets bénéfiques des GHS sur la

fonction cardiaque ont été observés chez des rats pourtant hypophysectomisés ou chez des patients déficients en GH [33, 34]. De plus, la ghréline et les GHS augmentent les performances cardiaques et exercent des effets protecteurs sur les atteintes ischémiques/reperfusion sur le cœur isolé [35]. Enfin, la ghréline et les GHS synthétiques agissent comme des facteurs de survie, en protégeant les cardiomyocytes et les cellules endothéliales contre l'apoptose induite par la doxorubicine. La ghréline est elle-même synthétisée et sécrétée par les cardiomyocytes [36].

Bien que les actions neuro-endocriniennes de la ghréline dépendent de son acylation sur la sérine 3, ses effets cardiovasculaires sont également observés avec la forme non acylée, ce qui suggère que ces actions ne dépendent pas du GHS-R 1a. Le CD36 est un récepteur d'épuration multifonctionnel de type B, impliqué dans l'athérogenèse et le métabolisme des lipoprotéines. Exprimé principalement par les cardiomyocytes et les cellules endothéliales de la microvasculature, le CD36 semble intervenir dans les effets cardiovasculaires sélectifs des GHS de nature peptidique [12].

Des effets de la ghréline ont également été décrits sur l'axe reproducteur (la ghréline inhibe l'activité proliférative des cellules de Leydig immatures), sur les systèmes immunitaires et ostéo-articulaires, ou encore sur le sommeil et l'anxiété [35]. Mais il est souvent difficile de déterminer s'il s'agit d'une action directe ou secondaire aux effets décrits plus haut (Figure 2).

Régulation physiologique de la ghréline et du GHS-R 1a

Un frein majeur pour évaluer précisément le rôle de la ghréline endogène est l'absence de méthode de dosage

Modèles animaux	Poids	GH/IGF1	Prise alimentaire (PA) ou quotient respiratoire (QR)	Références
Souris <i>ghréline</i> ^{-/-}	=		PA = ou ↓; QR ↓	[16, 23]
Souris surexprimant la ghréline non acylée	↓↓	↓↓	PA =	[48]
Souris <i>GHS-R</i> ^{-/-}	↓	↓	PA =	[24]
Rat surexprimant un ARNm GHS-R antisens	↓↓	?	PA ↓↓	[49]
Souris surexprimant le GHS-R dans les neurones à GHRH	↑↑	↑↑	ND	[50]

Tableau II. Modèles animaux d'inactivation ou de surexpression de la ghréline et du récepteur GHS-R.

suffisamment précise. En effet, la plupart des dosages commerciaux reconnaissent indifféremment les formes acylée et non acylée de la ghréline circulante. De plus, les demi-vies de ces formes diffèrent, la forme acylée disparaissant beaucoup plus rapidement, ce qui pourrait expliquer qu'elle ne représente que 10 % à 20 % de la ghréline plasmatique totale.

De nombreux espoirs ont été fondés sur la capacité de la ghréline à mimer ou amplifier l'oscillateur biologique régulant la sécrétion de GH, qui s'effectue selon un rythme ultradien. Néanmoins, s'il existe bien une rythmicité de la sécrétion de ghréline « totale », elle apparaît plus en phase avec la prise de nourriture qu'avec la sécrétion de GH [37]. Une telle absence de relation entre les concentrations de ghréline et de GH circulantes a ainsi été observée chez un patient souffrant d'un ghrélinome pancréatique, ne présentant aucun signe d'acromégalie, et qui avait des concentrations de ghréline plasmatique 50 fois supérieures aux valeurs témoins, mais des concentrations normales de GH et d'IGF-1 [38] (Tableau III). Il est vrai que les récepteurs GHS-R1a hypophysaires se désensibilisent rapidement [39]. De manière intéressante, l'effet adipogène de la ghréline en infusion continue semble moins sensible à la désensibilisation [21].

Les pics de ghréline sont observés immédiatement avant les repas, et les nadirs juste après [40]. Une variation circadienne a également été décrite, avec des concentrations plus élevées en début de nuit, suivies d'une chute juste avant le réveil [40]. Le jeûne est un régulateur majeur de la concentration de ghréline circulante, mais l'effet s'atténue avec le temps et les concentrations reviennent aux valeurs de base au bout de quelques jours. Chez l'homme, en l'absence d'indice temporel ou de nourriture, l'augmentation de ghréline est bien corrélée à la sensation de faim, ce qui renforce l'hypothèse du rôle orexigène du peptide [40].

Il existe une corrélation négative entre l'indice de masse corporelle et les concentrations plasmatiques de ghréline à jeun : l'amaigrissement chez le sujet obèse s'accompagne d'une augmentation des niveaux de ghréline [41], tandis que l'inverse est observé avec la prise de poids en cas d'anorexie nerveuse [42]. Les patients insulino-résistants ou souffrant d'un diabète de type 2 présentent également de faibles concentrations de ghréline cir-

culante [43], toujours en lien avec leur indice de masse corporelle [44].

Bien qu'un grand nombre de données sur la régulation de la ghréline et de l'expression du GHS-R par les hormones [35] aient été obtenues chez le rongeur, les différences interspèces compliquent leur interprétation.

Et la clinique dans tout ça ?

La première application des sécrétagogues de la GH (GHS) a été le diagnostic des déficiences en GH, en combinant GHRH et GHRP-6 [45]. Dans ce type d'affections, les GHS ne peuvent être utiles, d'un point de vue thérapeutique, que chez des patients ayant un axe hypothalamo-hypophysaire intact (brûlures, blessures, fractures, retard de croissance intra-utérin, personne âgée fragile...) (pour revue, voir [3]).

Un autre paradoxe de la ghréline a surgi de l'étude du syndrome de Prader-Willi, une des causes les plus fréquentes d'obésité d'origine génétique liée à une délétion en 15q11-15q13 et caractérisée par une hyperphagie massive, une déficience en GH et un hypogonadisme. Alors que les

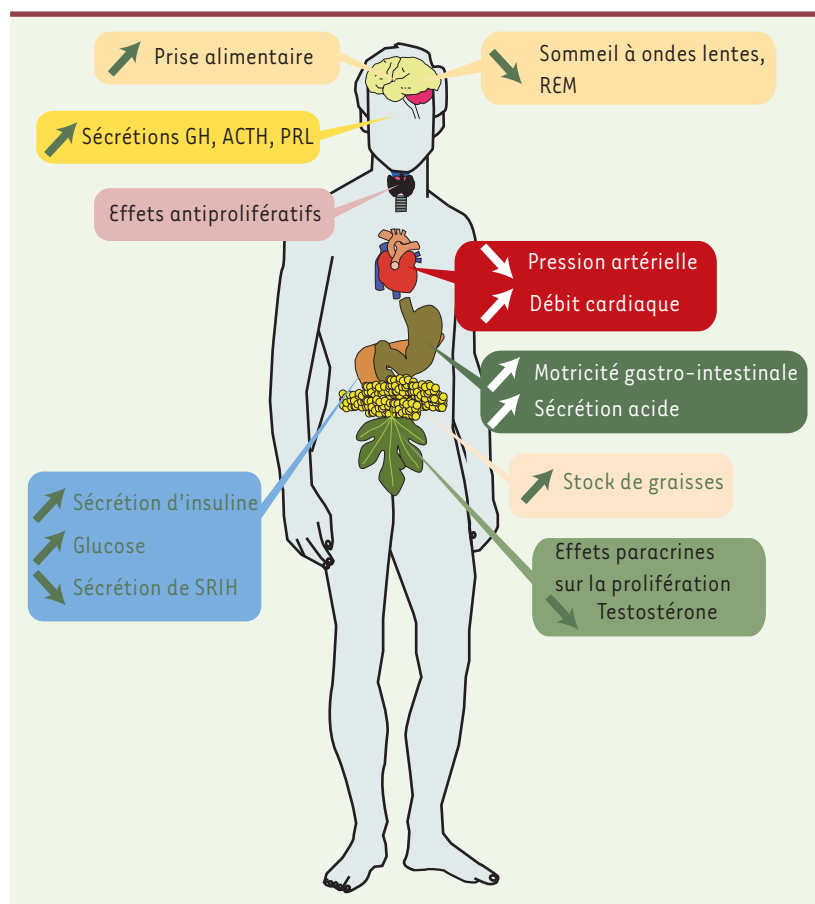


Figure 2. Effets pleiotropes de la ghréline et des sécrétagogues de la GH. L'acylation de la ghréline est nécessaire aux effets centraux, aux sécrétions hypophysaires, à la prise alimentaire et à certains effets métaboliques et gastro-intestinaux. La forme non acylée est impliquée dans l'adipogenèse, les effets cardiovasculaires et les phénomènes de prolifération/différenciation.

concentrations de ghréline sont abaissées dans tous les cas d'obésité humaine d'origine génétique (défiance en leptine, mutations du récepteur de la leptine ou du récepteur 4 de la mélanocortine, MC4), ou hypothalamique (craniopharyngiomes), elles sont particulièrement élevées dans le syndrome de Prader-Willi [46], du même ordre de grandeur qu'au cours de l'anorexie nerveuse : il a été proposé que ces concentrations très élevées de ghréline pouvaient contribuer à l'hyperphagie sévère des enfants atteints. Cependant, une perfusion de somatostatine chez quatre sujets adultes amènent les niveaux de ghréline aux valeurs normales sans diminuer l'appétit des patients [46]. Il est vrai qu'en même temps que la concentration de ghréline diminue, les concentrations du peptide YY3-36 (PYY3-36), une hormone anorexigène d'origine intestinale, augmentent... Il convient d'attendre la réalisation d'études utilisant un antagoniste du GHS-R 1a pour conclure quant au rôle de la ghréline dans l'hyperphagie liée à ce syndrome.

Dix-sept polymorphismes (SNP) ont été décrits pour le gène de la ghréline (pour revue, voir [35]). Le plus commun, Leu72Met, situé dans la séquence de la proghréline, est observé avec une fréquence de l'ordre de 10 % dans les populations caucasiennes. Il a été associé à un développement plus précoce de l'obésité dans certaines études, mais pas dans toutes, ainsi qu'à un indice de masse corporelle plus élevé et des concentrations d'insuline inférieures lors d'un test d'intolérance au glucose réalisé chez des enfants obèses de grande taille. Le polymorphisme Leu72Met n'intervient pas sur les concentrations circulantes du peptide mature dans sa forme bioactive ou non acylée. Le deuxième polymorphisme le plus fréquent (0,5 % à 2 % de la population selon les études), est Arg51Gln, situé au niveau du dernier acide aminé de la ghréline. Ce polymorphisme est susceptible de modifier la maturation de la proghréline et il a été associé (ou non) à des concentrations plus basses de ghréline circulante et à un risque accru de diabète de type 2.

En ce qui concerne le gène du GHS-R, 12 SNP ont été identifiés [35]. Deux d'entre eux ont été associés à des comportements boulimiques chez des enfants obèses. La mutation Ala204Glu, qui diminue considé-

ablement la liaison de la ghréline au récepteur GHS-R, a été retrouvée chez des enfants présentant un retard de croissance idiopathique d'origine familiale, avec tendance à l'obésité [47].

Conclusions

En résumé, découverte comme sécrétagogue de la GH, la ghréline se révèle être une hormone orexigène et adipogène circulante, d'origine gastrique, principalement : elle est en effet synthétisée par de nombreux tissus, ce qui suggère un rôle endocrine/paracrine plus diversifié. La ghréline semble idéalement placée, avec ses effets centraux et périphériques convergeant vers une utilisation ou un stockage de l'énergie.

Malgré la réelle potentialité clinique de la ghréline ou de ses analogues synthétiques, agonistes ou antagonistes, un certain nombre de questions restent posées : combien existe-t-il de récepteurs pour la ghréline ? La ghréline est-elle « le » ou seulement un des ligands endogènes des GHS-R ? Existe-t-il un équilibre physiologique entre la forme acylée et la forme non acylée et, si oui, quel est son rôle dans les multiples actions de la ghréline ? Toutes ces questions nécessitent une réponse afin de déterminer plus précisément le potentiel clinique et thérapeutique du système ghréline. ♦

SUMMARY

Ghrelin : a striking example of neuroendocrine peptide pleiotropy

Ghrelin, a peptide predominantly produced by the stomach, has been discovered as a natural ligand of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) type 1a. Shortly thereafter, it attracted enormous interest since it appeared as the

first peripheral orexigenic factor. Besides, ghrelin exerts other neuroendocrine metabolic and non-endocrine actions (e.g. cardiovascular activities) that may rely on the widespread distribution of ghrelin and its receptor (GHS-R). The existence of several GHS-R subtypes and evidences that neuroendocrine and metabolic but not all other ghrelin actions are dependent on acylation on serine 3 add further complexity to the system whose major physiological role remains to be definitely elucidated. Ghrelin knockout^(-/-) mice are neither anorectic nor dwarf though *GHS-R^{-/-}* are slightly underweight and do not respond to ghrelin with increased GH secretion or appetite. Thus, the continuation of the fascinating ghrelin story as well as its potential pathophysiological implications in endocrinology and internal medicine remain open avenues for future investigations. ♦

	Sécrétion de GH	Ghréline circulante	Prise alimentaire
Défiance en GH	↓	↓ ou =	↓ ou =
Acromégalie	↑↑↑	↓ ou =	↑ appétit
Anorexie	↑↑	↑↑	↓↓
Obésité	↓	↓	
Syndrome de Prader-Willi	↓	↑↑	↑↑
Ghrélinome	=	↑↑↑	?

Tableau III. Non-corrélation entre valeurs circulantes de GH et de ghréline, en relation avec la prise alimentaire, dans différentes conditions physiopathologiques. Dans le cas de l'obésité, des modifications non univoques de l'appétit et des préférences alimentaires sont observées. Un seul cas de ghrélinome a été décrit dans la littérature, et le comportement alimentaire de ce patient n'a pas été étudié.

RÉFÉRENCES

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth hormone-releasing peptide from stomach. *Nature* 1999; 402 : 656-60.
2. Bowers CY, Chang J, Momany FA, et al. Effects of enkephalins and enkephalins analogs on release of pituitary hormones *in vitro*. In: Mc Intyre I, Szelke M, eds. *Molecular endocrinology*. Amsterdam : Elsevier, 1977 : 287-92.
3. Thorner MO, Chapman IM, Gaylinn BD, et al. Growth hormone-releasing hormone and growth hormone-releasing peptide as therapeutic agents to enhance growth hormone secretion in disease and aging. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52 : 215-44.
4. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; 273 : 974-7.
5. Tullin S, Hansen BS, Ankersen M, et al. Adenosine is an agonist of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 2000; 141 : 3397-402
6. Tomasetto C, Karam SM, Ribieras S, et al. Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone : the motilin-related peptide. *Gastroenterology* 2000; 119 : 395-405.
7. Kojima M, Hosoda H, Kaiya H, et al. Discovery of ghrelin, an endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. In: Ghigo E, ed. *Ghrelin*. Boston : Kluwers, 2004 : 15-25.
8. Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, et al. High constitutive signaling of the ghrelin receptor : identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol* 2003; 17 : 2201-10.
9. Broglio F, Arvat E, Benso A, et al. Endocrine activities of cortistatin-14 and its interaction with GHRH and ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87 : 3783-90.
10. Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM, et al. Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem* 2003; 278 : 8877-80.
11. De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, et al. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates : identification of the cleavage sites. *Endocrinology* 2004; 145 : 4997-5005.
12. Bodart V, Febbraio M, Demers A, et al. CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res* 2002; 90 : 844-9.
13. Frieboes RM, Antonijevic IA, Held K, et al. Hexarelin decreases slow-wave sleep and stimulates the secretion of GH, ACTH, cortisol and prolactin during sleep in healthy volunteers. *Psychoneuroendocrinology* 2004; 29 : 851-60.
14. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86 : 5992-95.
15. Cowley MA, Smith RG, Diano S, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003; 37 : 649-61.
16. Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, et al. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101 : 8227-32.
17. Tannenbaum GS, Epelbaum J, Bowers CY. Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology* 2003; 144 : 967-74.
18. Nakazato M, Murakami N, Date Y, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409 : 194-8.
19. Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, et al. *In vivo* and *in vitro* effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 2001; 73 : 54-61.
20. Date Y, Murakami N, Toshinai K, et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; 123 : 1120-8.
21. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML, et al. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407 : 908-13.
22. Thompson NM, Gill DA, Davies R, et al. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly *in vivo* by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 2004; 145 : 234-42.
23. Sun Y, Ahmed S, Smith RG. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol* 2003; 23 : 7973-81.
24. Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 30 : 101 : 4679-84
25. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, et al. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276 : 905-8.
26. Fujino K, Inui A, Asakawa A, et al. Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *J Physiol* 2003; 550 : 227-40.
27. Trudel L, Tomasetto C, Rio MC, et al. Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282 : G948-52.
28. Sibilia V, Rindi G, Pagani F, et al. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats : studies on the mechanisms of action. *Endocrinology* 2003; 144 : 353-9.
29. Tatsuguchi A, Miyake K, Gudis K, et al. Effect of *Helicobacter pylori* infection on ghrelin expression in human gastric mucosa. *Am J Gastroenterol* 2004; 99 : 2121-7.
30. Zhang W, Chen M, Chen X, et al. Inhibition of pancreatic protein secretion by ghrelin in the rat. *J Physiol* 2001; 537 : 231-6.
31. Arosio M, Ronchi CL, Gebbia C, et al. Stimulatory effects of ghrelin on circulating somatostatin and pancreatic polypeptide levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88 : 701-4.
32. Broglio F, Gottero C, Prodam F, et al. Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89 : 3062-5.
33. Torsello A, Bresciani E, Rossoni G, et al. Ghrelin plays a minor role in the physiological control of cardiac function in the rat. *Endocrinology* 2003; 144 : 1787-92.
34. Bisi G, Podio V, Valetto MR, et al. Cardiac effects of hexarelin in hypopituitary adults. *Eur J Pharmacol* 1999; 381 : 31-8.
35. Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, et al. Ghrelin. A hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25 : 27-68.
36. Iglesias MJ, Pineiro R, Blanco M, et al. Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2004; 62 : 481-8.
37. Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, et al. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 2002; 143 : 1353-61.
38. Corbetta S, Peracchi M, Cappiello V, et al. Circulating ghrelin levels in patients with pancreatic and gastrointestinal neuroendocrine tumors : identification of one pancreatic ghrelinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88 : 3117-20.
39. Camina JP, Carreira MC, El Messari S, et al. Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. *Endocrinology* 2004; 145 : 930-40.
40. Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, et al. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287 : E297-304.
41. Hansen TK, Dall R, Hosoda H, et al. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol* 2002; 56 : 203-6
42. Tolle V, Kadem M, Bluet-Pajot MT, et al. Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88 : 109-16.
43. Poynko SM, Kellokoski E, Horkko S, et al. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52 : 2546-53.
44. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87 : 240-4.
45. Pombo M, Leal-Cerro A, Barreiro J, et al. Growth hormone releasing hexapeptide-6 (GHRP-6) test in the diagnosis of GH-deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1996; 9 : 333-8.
46. Tan TM, Vanderpump M, Khoo B, et al. Somatostatin infusion lowers plasma ghrelin without reducing appetite in adults with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89 : 4162-5.
47. Pantel J, Cabrol S, Nivot S, et al. *Familial short stature associated with a mutation in the growth hormone secretagogue receptor (GHSR)*, 86th Annual meeting of the Endocrine Society. New Orleans : Endocrine Society, 2004 : 010-6 (abstract).
48. Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, et al. Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology* 2005; 146 : 355-64.
49. Shuto Y, Shibasaki T, Ottagiri A, et al. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest* 2002; 109 : 1429-36.
50. Lall S, Balthasar N, Carmignac D, et al. Physiological studies of transgenic mice overexpressing growth hormone (GH) secretagogue receptor 1A in GH-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2004; 145 : 1602-11.
51. Smith RG, Cheng K, Schoen WR, et al. A nonpeptidyl growth hormone secretagogue. *Science* 1993; 260 : 1640-3.

TIRÉS À PART
J. Epelbaum



Zizzari P, Bluet-Pajot MT. La ghreline, du GH sécrétagogue au peptide orexigène. Métab Horm Diabète et Nut. Mars-Avr 2004 (VolVIII n°2):58-65

La ghréline, du GH sécrétagogue au peptide orexigène

P. Zizzari*, M.T. Bluet-Pajot*

points FORTS

- ▲ Les GH sécrétagogues sont des substances peptidiques ou non qui stimulent très fortement la sécrétion de GH en activant un récepteur différent de celui de la somatolibérine (GHRH).
- ▲ La distribution du récepteur des GH sécrétagogues (GHS-R) est ubiquitaire, ce qui suggère différentes fonctions pour le ou les ligand(s) endogène(s) de ce récepteur.
- ▲ La ghréline, un peptide de 28 acides aminés avec une n-octanoylation sur la sérine en position 3, est un ligand endogène du GHS-R.
- ▲ L'estomac est le principal site de synthèse de la ghréline.
- ▲ La ghréline stimule la sécrétion de GH en agissant principalement au niveau hypothalamique, où elle inhibe la libération de somatostatine et stimule celle de GHRH.
- ▲ La ghréline augmente la prise alimentaire, notamment en activant des neurones du noyau arqué hypothalamique qui coexpriment NPY/AgRP, deux neuropeptides anaboliques.
- ▲ En traitement chronique, la ghréline est adipogène.
- ▲ La ghréline aurait aussi des effets cardioprotecteurs et hémodynamiques bénéfiques.
- ▲ Chez l'homme, la ghréline est libérée selon un rythme à la fois ultradien et circadien. Les concentrations plasmatiques de ghréline semblent corrélées aux épisodes de prise alimentaire.
- ▲ Les concentrations plasmatiques de ghréline sont augmentées chez les patients anorexiques et diminuées chez les patients obèses par rapport à celles observées chez les sujets contrôles.

Mots-dés : Ghréline – Hormone de croissance – Prise alimentaire – Anorexie – Obésité.

La ghréline, un peptide de 28 acides aminés octanoylé sur la sérine en position 3, a été identifiée en 1999 comme étant un ligand endogène du GHS-R1a, un récepteur des GH sécrétagogues (GHS), famille de substances synthétiques stimulant très fortement la sécrétion d'hormone de croissance (GH). La ghréline est majoritaire-

ment synthétisée dans l'estomac, elle circule dans le sang, à la fois sous une forme octanoylée et sous une forme non octanoylée, et agit, entre autres, au niveau hypothalamique, où sont concentrés les récepteurs des GHS. Après administration aiguë, la ghréline octanoylée stimule non seulement la sécrétion d'hormone de croissance mais aussi la prise alimentaire et, en traitement chronique, elle entraîne une prise de poids due à une accu-

mulation des graisses. Très récemment, il a été montré que la forme non octanoylée, qui ne stimule ni la sécrétion de GH ni la prise alimentaire, a un effet adipogène comme la forme octanoylée, ce qui suggère l'existence d'au moins deux récepteurs des GHS (la présence de l'octanoylation étant nécessaire pour que le récepteur GHS-R1a, seul identifié à ce jour, soit activé). En l'état actuel des connaissances, la sécrétion endogène de ghréline totale (octanoylée + non octanoylée) ne semble bien corrélée qu'à la prise alimentaire, et les concentrations plasmatiques de ghréline totale sont notamment augmentées dans l'anorexie et diminuées dans l'obésité. L'intérêt pour ce peptide réside maintenant dans son implication dans la régulation de la balance énergétique.

Découverte de la ghréline

La découverte de la ghréline est un bel exemple de pharmacologie inverse, et aura nécessité près de 20 années de recherche.

Les GH sécrétagogues (GHS)

Tout a commencé en 1984 avec la synthèse d'un hexapeptide, His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂, dérivé d'un opiacé, la Met-enképhaline. Ce peptide ne présente plus aucune activité opiacée, mais il stimule très fortement la sécrétion d'hormone de croissance (GH), aussi bien in vitro qu'in vivo. Il a été dénommé GHRP6 (*Growth Hormone Releasing Peptide 6*). À cette époque, de nombreux laboratoires

* INSERM, Paris.

recherchaient une substance capable de mimer ou d'amplifier l'oscillateur biologique qui régule la sécrétion de GH, afin de pallier certains déficits en GH, notamment celui dû à l'âge. Ce peptide va donc ouvrir la voie au développement d'une famille de substances peptidiques et non peptidiques, les GH sécrétagogues (GHS), qui, toutes, stimulent la sécrétion de GH en agissant via un récepteur distinct de celui de la somatolibérine (GHRH). En effet, d'une part, les GHS stimulent la sécrétion de GH en synergie avec la GHRH et, d'autre part, la liaison des GHS à leur récepteur active la voie de transduction de la phospholipase C en stimulant le turn over des IP3 et la PKc, augmentant ainsi la libération de calcium intracellulaire, alors que la liaison de la GHRH active la voie AMPc.

Le récepteur des GHS (GHS-R)

L'augmentation de calcium intracellulaire après liaison d'un GHS à son récepteur a été utilisée en 1996 pour isoler ce dernier à partir d'une banque d'ADNc d'hypophyses de porc. C'est un récepteur qui appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G, et dont le gène est localisé sur le chromosome 3 (3q26). Il est principalement exprimé dans le système nerveux central, l'hypophyse, la thyroïde, le pancréas, la rate, le cœur et les surrénales (*tableau*). Au niveau central, le GHS-R est exprimé par respectivement 27 % et 22 % des neurones exprimant la GHRH dans les noyaux arqués (ARC) et ventromédian (VMN) hypothalamiques, et par quelques neurones hypophysiotropes à SRIH dans le noyau periventriculaire. L'idée a été émise que le ligand endogène de ce récepteur pourrait être un modulateur de la libération de GHRH et de SRIH dans le sang porte hypophysaire, ce qui suggère aussi l'existence d'un nouveau système de régulation de la sécrétion de GH. Par

ailleurs, le GHS-R est exprimé par 97 % des neurones exprimant le NPY, 30 % de ceux exprimant la SRIH et 8 % de ceux exprimant la POMC au niveau de l'ARC. Il est également présent dans le gyrus denté, l'hippocampe, l'aire tegmentale ventrale, la substance noire et le noyau du raphé. Une telle distribution dans le système nerveux central suggère que son (ou ses) ligand(s) endogène(s) pourrait(en)t être impliqué(s) non seulement dans la régulation de la sécrétion de GH, mais aussi dans la régulation de la prise alimentaire, de la pression artérielle, de la nociception et des comportements affectifs, ainsi que dans les processus d'apprentissage et de mémorisation.

La ghréline

Ce récepteur est resté orphelin jusqu'en décembre 1999, date à laquelle une équipe japonaise a purifié un ligand endogène à partir d'estomac de rat, ligand qu'ils ont nommé ghréline (racine proto-indo-européenne *ghre* pour *grow*, et suffixe *relin* pour *releasing substance*) (1). Il n'y a pas

d'homologie structurale entre la ghréline et les GHS synthétiques. En effet, la ghréline est un peptide de 27 ou 28 acides aminés qui subit une modification post-traductionnelle tout à fait unique, au cours de laquelle un groupement octanoyl est lié de façon covalente à la sérine en position 3. Le mécanisme aboutissant à cette modification est inconnu à ce jour, mais, alors que seuls les quatre premiers acides aminés en position N terminale sont nécessaires pour la liaison et l'activation du récepteur, le groupement octanoyl est indispensable. De façon intéressante, les quatre premiers acides aminés sont conservés chez les primates, les rongeurs, les poissons, les amphibiens et les oiseaux, ce qui suggère un rôle physiologique important de la ghréline. Chez l'homme, la n-octanoylation n'est pas la seule modification de la sérine qui permette le maintien de l'activité de la ghréline ; il existe également une décanoylation et une décénoylation. La ghréline circule majoritairement sous la forme non octanoylée : la forme octanoylée majoritaire (ghréline 1-28) ne représente que 10 à 20 % du total).

Tableau. Principaux sites de distribution du GHS-R de type 1a chez l'homme et de l'immunoréactivité ghréline chez le rat.

Au niveau central		Au niveau périphérique	
GHS-R1a	Ghréline	GHS-R1a	Ghréline
Hypothalamus	Hypothalamus	Hypophyse	Hypophyse
Plexus choroïdes			Estomac
Cortex cérébral			Duodénum
Hippocampe			Jéjunum
Medulla oblongata			Iléon
Thalamus			Cæcum
Striatum			Côlon
Substance noire		Pancréas	Pancréas
Cervelet		Foie	Foie
Corps calleux		Rein	Rein
		Surrénales	Surrénales
		Myocarde	Oreille, ventricule
		Aorte	Aorte
		Poumons	Poumons
		Thyroïde	Thyroïde
		Testicules	Testicules
		Tissu adipeux	Glande sous-max.
		Rate	Thymus
		Utérus	
		Muscle squelettique	

Récemment, il a été détecté dans le sang des fragments de la partie C terminale de la pro-ghréline, dont la fonction n'est pas encore connue. L'estomac est le principal site de synthèse de la ghréline, mais des taux non négligeables de cette hormone sont trouvés dans l'intestin grêle, le côlon, le pancréas, le rein, le cœur et le placenta (**tableau**). Le fundus contient dix à vingt fois plus de ghréline que le duodénum. Des concentrations plus faibles de ghréline sont présentes dans le jéjunum et l'iléon, diminuant généralement au fur et à mesure que la distance par rapport à l'estomac augmente. Au niveau de l'estomac, la ghréline est synthétisée en majorité par les cellules de type *X/A-like*. Ces cellules représentent à peu près 20 % de la population des cellules endocrines de la muqueuse oxyntique. Elles sont associées au réseau capillaire s'étendant au travers de la lamina propria de l'estomac et n'ont pas de continuité avec la lumière du tube digestif (d'où leur dénomination de "cellules *dosed-type*"). Dans le reste du tractus gastro-intestinal, la ghréline est présente dans des cellules de l'épithélium des cryptes et des villi, cellules qui sont en contact avec la lumière du tube digestif (d'où leur dénomination de "cellules *opened-type*"). Ces dernières seraient régulées par des informations chimiques ou physiques provenant de la lumière du tube, comme le pH ou les nutriments, alors que les cellules "*closed type*" sont sous la dépendance d'hormones, de stimulations neuronales ou de distensions mécaniques. Au niveau central, la ghréline est exprimée dans un groupe de neurones appartenant au troisième ventricule dans un espace internucléaire entre les noyaux latéral (LH), arqué (ARC), ventromédian (VMH), dorsomédian (DMH) et paraventriculaire (PVN) hypothalamiques. Ces neurones innervent plusieurs noyaux hypothalamiques (ARC, DMH, LH et PVN), mais aussi des régions extrahypothalamiques (amygdales, noyau paraventriculaire thalamique, habé-

nula). Au niveau hypothalamique, des boutons de ghréline immunoréactifs établissent soit des contacts synaptiques sur les corps cellulaires ou les dendrites des neurones à neuropeptide Y (NPY), AGRP et pro-opiomélanocortine (POMC) dans l'ARC, et à corticolibérine (CRH) dans le PVN, soit des appositions directes sur les terminaisons axonales des neurones à NPY dans l'ARC et à GABA dans le PVN. Néanmoins, étant donné les faibles quantités de ghréline immunoréactive détectées au niveau central, le débat sur l'origine de la ghréline agissant à ce niveau reste ouvert.

Effets induits par l'administration de ghréline

Sur la sécrétion d'hormone de croissance

De façon attendue, la ghréline, ligand endogène du récepteur des GHS, stimule la sécrétion de GH aussi bien in vivo qu'in vitro dans toutes les espèces étudiées. Chez l'homme, la ghréline stimule la sécrétion de GH, et l'amplitude de la réponse est plus importante que celle observée après administration d'une quantité équivalente de GHRH. De plus, la ghréline combinée à la GHRH stimule la sécrétion de GH de façon synergique. In vitro, chez le rat, elle stimule la sécrétion de GH de manière dépendante de la dose, directement à partir d'hypophysés périfusées. De façon intéressante, un peptide endogène correspondant aux 18 premiers acides aminés (bien que son existence n'ait pas encore été prouvée, il pourrait être produit par clivage à partir de la ghréline, vu l'existence d'un doublet dibasique en position 19-20) induit le même effet pourvu que la n-octanoylation soit présente, ce qui est en accord avec le fait que seuls les quatre premiers acides aminés

sont nécessaires pour activer le récepteur. Chez le rat vigile, libre de ses mouvements, la ghréline, administrée en intraveineux, induit une stimulation rapide et transitoire de la sécrétion de GH. Les concentrations basales de GH sont multipliées par un facteur 20 à 50, dix minutes après l'injection, et retournent aux valeurs initiales après quarante à soixante minutes. Dans la mesure où, in vitro, la ghréline à dose maximale n'augmente la sécrétion de GH que d'un facteur 2 à 3, cela montre que son action est majoritairement centrale. Elle inhibe probablement la libération de somatostatine (SRIH) et stimule celle de GHRH. D'une part, elle présente la même efficacité qu'elle soit injectée en période de sécrétion basse de GH, c'est-à-dire de tonus élevé en SRIH, ou lors d'un pic spontané correspondant à un tonus bas en SRIH, contrairement à la GHRH, qui ne peut augmenter la sécrétion de GH que si le tonus somatostatinergique est bas. D'autre part, la ghréline ne peut induire une réponse de GH que si le système GHRH endogène est intact : une immunisation passive contre la GHRH diminue très fortement l'effet de la ghréline sur la GH (**figure 1**).

Il est à noter que la ghréline pourrait aussi influencer la libération de prolactine, de cortisol, d'ACTH et d'aldostérone, comme le rapportent certaines études cliniques, mais les mécanismes mis en jeu dans ces effets n'ont pas été élucidés à ce jour.

Sur le comportement alimentaire

Chez l'homme, l'administration de ghréline induit une sensation de faim, et l'infusion intraveineuse de ghréline (5 pmol/kg/mn) pendant les quatre heures qui précèdent le déjeuner entraîne une augmentation de 28 % de l'apport calorique au cours du repas, sans modification de la proportion de carbohydrates, de protéines ou de lipides ingérés (2). Il en est de même chez le rat, qui,

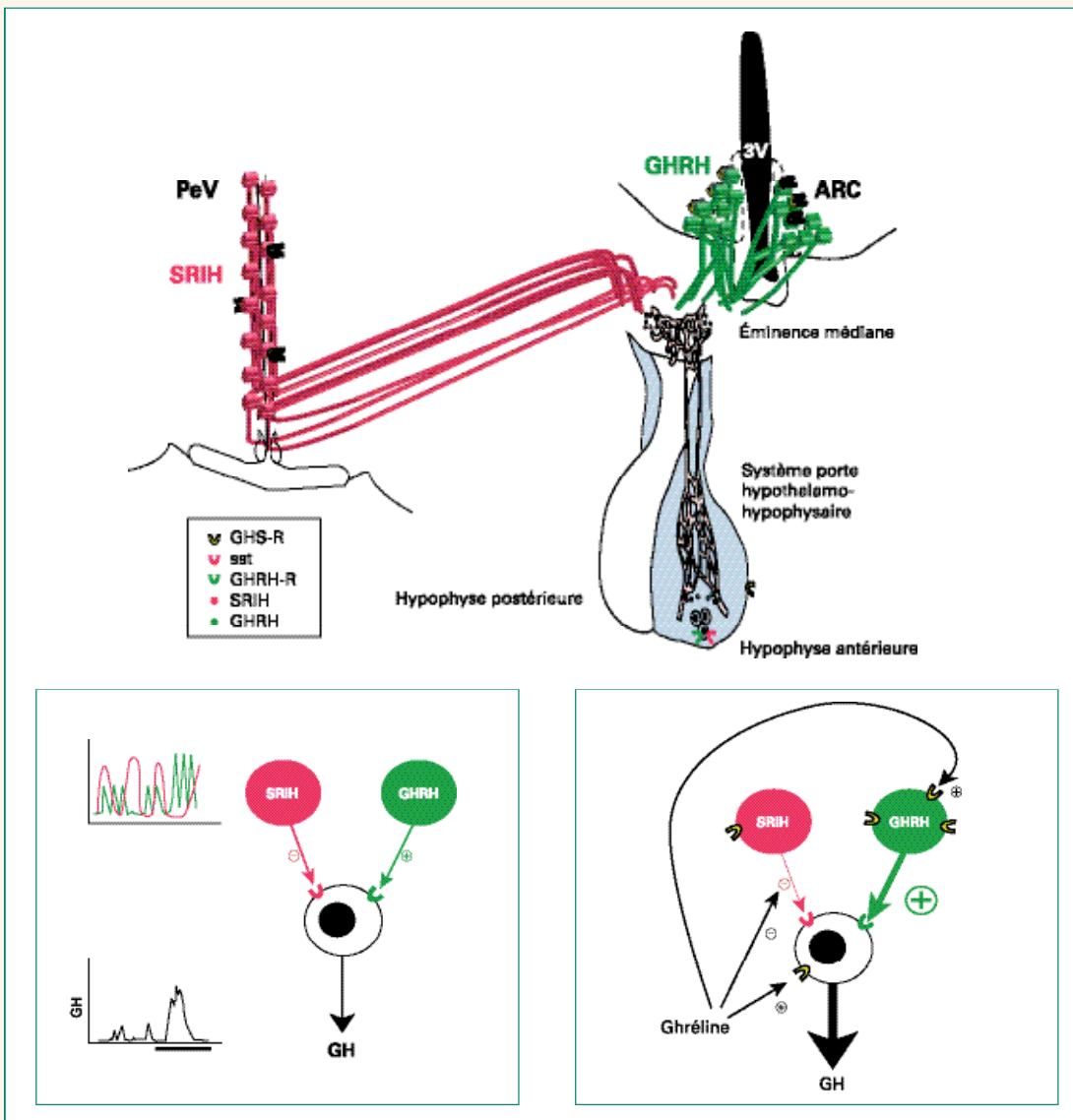


Figure 1. Régulation de la sécrétion d'hormone de croissance (GH). La sécrétion rythmique de GH par les cellules adénohypophysaires est principalement sous le contrôle négatif de la somatostatine (SRIH) et sous le contrôle positif de la somatolibérine (GHRH). SRIH et GHRH sont libérées dans le sang porte par des neurones issus respectivement des noyaux périvericulaire et arqué hypothalamiques. L'apparition d'un pic de sécrétion de GH résulte d'une diminution de la sécrétion de SRIH, son amplitude étant alors fonction de la concentration en GHRH. La ghréline stimule la sécrétion de GH directement au niveau hypophysaire et indirectement au niveau hypothalamique, en inhibant la libération de SRIH et en stimulant la libération de GHRH.

ARC : noyau arqué hypothalamique ; PeV : noyau périvericulaire hypothalamique ; GHS-R : récepteur des GH sécrétagogues ; GHRH-R : récepteur de GHRH ; sst : récepteur de SRIH.

immédiatement après l'administration de ghréline, se met à manger, quel que soit son comportement alimentaire à cet instant, et la durée de la prise alimentaire dans la demi-

heure qui suit est très significativement augmentée par rapport à celle d'un animal recevant un placebo (3). De façon intéressante, les doses efficaces en intracérébroventriculaire

sont 1 000 fois inférieures à celles nécessaires en intraveineux, ce qui suggère un effet central majeur. Le délai très court nécessaire à l'induction du comportement alimen-

taire (3 à 5 mn) laisse supposer que cet effet ne dépend pas de l'augmentation de GH induite par le peptide, puisque cette dernière n'est observée qu'après cinq minutes. Cela est confirmé par le fait que la ghréline stimule la prise alimentaire de façon comparable chez des animaux déficients en GH (rats Dwarf ou souris Lit/lit). L'effet orexigène de la ghréline est relayé, en partie, par l'activation de neurones du noyau arqué hypothalamique qui coexpriment NPY/AgRP, deux neuropeptides anaboliques. En effet, l'administration chronique de ghréline entraîne une augmentation des ARN messagers du NPY et de l'AgRP, et un prétraitement avec un anticorps anti-NPY ou anti-AgRP ou avec des antagonistes du NPY ou de l'AgRP inhibe l'effet orexigène de la ghréline. La ghréline exerce aussi une action antagoniste de celle de la leptine sur ces neurones, puisqu'elle lève l'inhibition induite par la leptine à la fois sur l'expression de NPY et sur la prise alimentaire. En revanche, les neurones à POMC, peptide anorexigène, bien qu'exprimant le récepteur des GHS, ne semblent pas être directement impliqués dans la régulation de la prise alimentaire par la ghréline, l'administration centrale de ghréline ne modifiant pas l'expression de la POMC au niveau du noyau arqué. Néanmoins, une implication indirecte de ces neurones ne peut être exclue, puisque l'application de ghréline sur des coupes d'hypothalamus hypopolarise les neurones à POMC (figure 2). D'autres voies sont probablement mises en jeu, puisqu'il a été montré que l'injection de ghréline activait l'oncogène c-Fos dans différentes régions impliquées dans la régulation de la prise alimentaire autres que l'ARC, telles que les noyaux paraventriculaire et dorsomédian ainsi que l'aire latérale hypothalamique (ALH), le noyau du tractus solitaire et l'area postrema. La ghréline pourrait activer les neurones à orexine, puisque, chez le rat, un anti-orexine A et B diminue la quantité de nourriture ingérée après administration de ghréline. Dans la

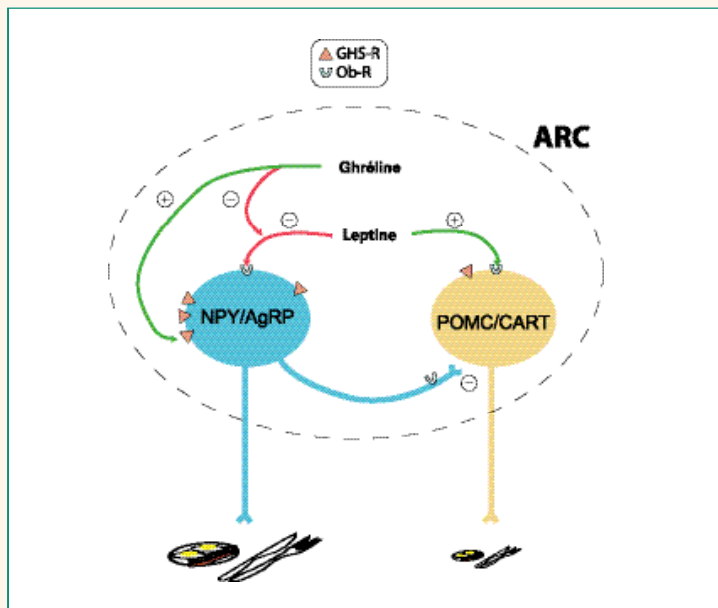


Figure 2. Contrôle de la prise alimentaire : régulation des voies NPY/AgRP et POMC/CART par la ghréline et la leptine.
 NPY : neuropeptide Y ; AgRP : peptide associé au gène Agouti ; POMC : pro-opiomélanocortine ; CART : transcrit régulé par la cocaïne et l'amphétamine ; GHS-R : récepteur des GH sécrétagogues ; Ob-R : récepteur de la leptine ; ARC : noyau arqué hypothalamique.

mesure où les GHS-R sont peu exprimés dans l'ALH, cet effet pourrait être indirect et impliquer les neurones à NPY/AgRP qui projettent sur les neurones à orexine dans cette aire. L'hypothèse que la ghréline soit capable de déclencher la prise alimentaire à court terme est compatible avec les observations suivantes : a) elle est principalement produite par l'estomac, qui est sensible à l'apport de nutriments ; b) sa concentration dans le plasma augmente avec le jeûne, et diminue rapidement après renutrition ; c) la ghréline exogène déclenche la prise alimentaire chez le rat même lorsque l'injection a lieu à un moment où l'animal ne mange pas habituellement ; d) l'effet orexigène de la ghréline est rapide et court ; e) elle stimule la motilité et la sécrétion d'acides gastriques, qui sont connues pour intervenir dans l'anticipation des repas ; f) elle agit via NPY/AgRP, qui sont impliqués dans le contrôle central de la prise alimentaire.

À long terme, la ghréline augmente l'accumulation de graisse, et participerait à la régulation de la prise de poids, comme le montrent les résultats obtenus après administration continue ou répétée du peptide. Très récemment, il a été montré que l'adiposité serait induite par une action périphérique directe aussi bien de la ghréline octanoylée que de la ghréline non octanoylée, ce qui implique l'existence d'un autre récepteur pour les GHS, puisque le GHS-R1a, seul GHS-R connu actuellement, n'est pas activé par la forme non octanoylée.

Sur le sommeil

Chez l'homme, l'injection de 50 mg de ghréline toutes les heures de 22 heures à 1 heure du matin augmente la durée du sommeil à ondes lentes et diminue celle du sommeil paradoxal dans la seconde partie de la nuit. Chez le rat, trois administrations de ghréline à 3-4 heures d'inter-

valle (une pendant la période diurne et deux pendant la période nocturne) diminuent la durée du sommeil paradoxal. Les mécanismes impliqués dans cet effet ne sont pas connus.

Sur l'anxiété

Un effet anxiogène de la ghréline a également été rapporté chez la souris. Cet effet pourrait être relayé par l'activation des neurones à corticolibérine du noyau paraventriculaire hypothalamique, l'expression de la corticolibérine étant augmentée après injection intracérébroventriculaire de 3 nmol de ghréline.

Sur le système cardiovasculaire

Les GHS-R sont largement distribués dans le tissu cardiovasculaire humain, ce qui suggère que les GHS et la ghréline pourraient jouer un rôle dans la physiologie et la pathologie vasculaires. De fait, la ghréline semble exercer des effets cardioprotecteurs et des effets hémodynamiques bénéfiques. En effet, d'une part, elle inhibe l'apoptose des cellules myocardiques et endothéliales *in vitro* et, d'autre part, chez l'homme, elle diminue la pression artérielle moyenne et augmente le débit cardiaque.

Sur l'estomac, le pancréas

La ghréline stimule l'acidité gastrique, ainsi que la contraction et le remplissage gastriques, au moins en partie, en modulant l'activité cholinergique du nerf vague.

Chez l'homme, il a été rapporté une hyperglycémie suivie d'une diminution paradoxale de la sécrétion d'insuline après administration de ghréline.

Sur la prolifération cellulaire

Des sites de liaison ghréline-spécifique, d'une part, et une expression de ghréline, d'autre part, ont été

détectés dans de nombreuses tumeurs humaines. Dans la plupart des modèles étudiés, la ghréline inhibe la prolifération cellulaire, et il est suggéré qu'elle pourrait agir de manière autocrine ou paracrine.

Ghréline endogène

Jusqu'à très récemment, la plupart des équipes qui mesuraient les concentrations de ghréline, soit par dosage radio-immunologique, soit par dosage immuno-enzymatique, n'avaient à leur disposition que des anticorps dirigés contre la partie C terminale du peptide, anticorps qui ne permettent pas de différencier la forme biologiquement active de la forme non active. Pour cette raison, les valeurs de ghréline publiées à ce jour correspondent, dans la majorité des cas, aux valeurs de ghréline totale (active + non active).

Chez le rat, la ghréline totale est libérée de façon épisodique, les valeurs maximales n'étant que 1,5 à 2 fois plus élevées que les minimales. Bien que le nombre de pics observés pendant neuf heures ($2,7 \pm 0,4$) ne soit pas différent de celui observé pour l'hormone de croissance ($2,3 \pm 0,3$), les pics de GH sont plus réguliers que ceux de ghréline, comme le montre un test d'entropie approximative ($0,968 \pm 0,058$ pour la ghréline versus $0,796 \pm 0,062$ pour la GH), et il n'existe pas de corrélation entre les valeurs de la GH et celles de la ghréline. Par ailleurs, une étude récente publiée par Okimura et al. montre que les taux de ghréline non active mais aussi active sont équivalents quel que soit le moment du cycle de GH (pic ou nadir). Néanmoins, ces auteurs n'effectuent des prélèvements sanguins que toutes les trente minutes, et la demi-vie de la ghréline active ne semble être que d'une dizaine de minutes, ce qui nécessiterait des mesures beaucoup plus rapprochées pour conclure. Il existe, en revanche, une relation étroite entre taux de ghréline et prise ali-

mentaire, les taux de ghréline diminuant de 26 % dans les vingt minutes qui suivent la fin de la prise de nourriture (3).

Chez l'homme, les résultats publiés par Cummings et al. (4) montrent que la ghréline serait sécrétée selon un rythme à la fois ultradien et circadien. En effet, ces auteurs montrent quatre pics sécrétoires de ghréline par période de 24 heures, trois d'entre eux correspondant aux heures des repas et le quatrième étant observé la nuit. Par ailleurs, les taux de base augmentent progressivement au cours de la journée. Le fait que les taux de ghréline augmentent avant et diminuent après un repas est compatible avec un rôle de la ghréline endogène dans la sensation de faim et l'induction du comportement alimentaire. De plus, le fait que le blocage de la ghréline endogène diminue la prise alimentaire et la croissance corporelle suggère qu'un certain tonus en ghréline est nécessaire pour maintenir un appétit normal et que, à long terme, la ghréline participe à la régulation du poids corporel. Récemment, Barkan et al. (5) ont rapporté des profils de ghréline moins réguliers mais présentant un dimorphisme sexuel, avec des taux plus élevés chez la femme. Dans cette étude, les profils d'hormone de croissance ont également été déterminés, et il n'y a pas de relation stricte entre taux de GH et taux de ghréline. Plusieurs données suggèrent que la ghréline pourrait intervenir, d'une part, dans la régulation de la sécrétion de GH et, d'autre part, dans celle de la prise alimentaire et du poids corporel, en agissant sur des sous-types de récepteurs différents. En effet, un antagoniste du GHS-R1A, le (D-Lys-3) GHRP6, ne modifie pas de façon significative la sécrétion de GH chez le rat, mais diminue la prise alimentaire chez la souris. De même, des rats transgéniques exprimant un antisens du gène du récepteur des GHS ont, par rapport à leurs contrôles, un poids corporel et une consommation de nourriture inférieurs, et moins de tissus adipeux.

de la régulation du poids

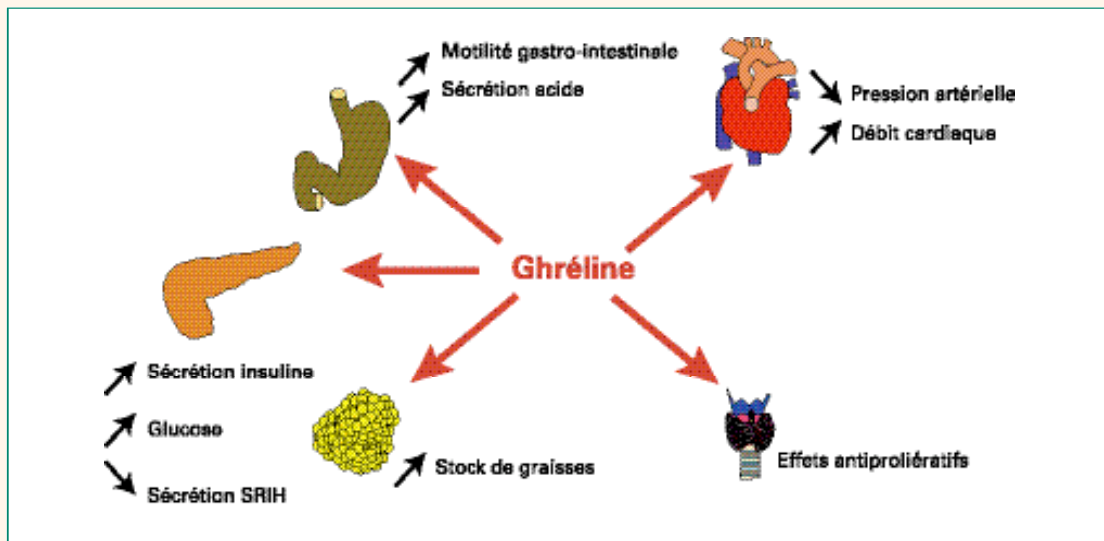


Figure 3. Effets périphériques de la ghréline.

En revanche, leur sécrétion de GH ne semble pas significativement altérée. Les taux de ghréline circulante sont bas chez les patients obèses (6) et élevés chez les patients anorexiques ou boulimiques (7, 8). De façon intéressante, les femmes qui présentent une maigreur constitutionnelle non associée à des troubles psychologiques et un index de masse corporelle équivalent à celui des anorexiques mais un pourcentage de masse grasse normal ont des taux de ghréline normaux, ce qui indique

que ces taux dépendent de la masse grasse (7). De plus, chez l'obèse, une diminution de seulement 5 % du poids corporel suffit pour que les taux de ghréline augmentent. Cette augmentation est probablement liée directement à la perte de poids et de masse grasse, et non à une diminution de l'inhibition induite par les nutriments ingérés, puisqu'elle est retrouvée chez des patients dont la perte de poids et de masse grasse est due à un exercice physique prolongé, sans hypophagie (9).

Conclusion

Découverte en tant que GH sécrétagogue endogène en décembre 1999, la ghréline suscite actuellement un intérêt centré davantage sur son implication dans la régulation de la balance énergétique que sur son implication dans la régulation de la sécrétion d'hormone de croissance. Elle est la seule hormone périphérique qui stimule l'appétit et l'accumulation des graisses. Ce dernier effet est

Auto-test

1. La ghréline, ligand endogène du récepteur des GH sécrétagogues, stimule spécifiquement la sécrétion de GH. Vrai ou faux ?
2. La n-octanoylation sur la sérine en position 3 est indispensable pour l'activité biologique de la ghréline. Vrai ou faux ?
3. La ghréline est lipolytique. Vrai ou faux ?
4. La ghréline, peptide orexigène, est augmentée chez les patients obèses. Vrai ou faux ?

1. Faux : elle stimule aussi la sécrétion de prolactine, d'ACTH, de cortisol et d'aldostérone, et a de nombreux autres effets.
2. Vrai : pour son effet sur la sécrétion de GH, non pour son effet adipogène.
3. Faux : elle stimule la GH, qui a une action lipolytique, mais, par elle-même, elle a un effet adipogène, ce qui suggère l'existence de plusieurs récepteurs.
4. Faux.

assez paradoxal, compte tenu de son action sur la sécrétion d'hormone de croissance – hormone connue pour son action lipolytique –, et suggère l'existence de plusieurs récepteurs et/ou d'une localisation différente de ces récepteurs.

Références

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402(6762):656-60.
2. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(12):5992.
3. Tolle V, Bassant MH, Zizzari P et al. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 2002;143(4):1353-61.
4. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS et al. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001;50(8):1714-9.
5. Barkan AL, Dimaraki EV, Jessup SK, Symons KV, Emolenko M, Jaffe CA. Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(5):2180-4.
6. Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA et al. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001;50(4):707-9.
7. Tolle V, Kadem M, Bluet-Pajot MT et al. Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(1):109-16.
8. Tanaka M, Nanno T, Muranaga T et al. Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2002;146(6):R1-R3.
9. Cummings DE, Shannon MH. Roles for ghrelin in the regulation of appetite and body weight. *Arch Surg* 2003;138(4):389-96.

Bluet-Pajot MT, Tolle V, Zizzari P, Robert C, Hammond C, Mitchell V, Beauvillain JC, Viollet C, Epelbaum J, Kordon C. Growth hormone secretagogues and hypothalamic networks. *Endocrine*. 2001 Feb;14(1):1-8.

Growth Hormone Secretagogues and Hypothalamic Networks

Marie-Thérèse Bluet-Pajot,¹ Virginie Tolle,¹ Philippe Zizzari,¹ Christophe Robert,¹ Constance Hammond,¹ Valérie Mitchell,² Jean-Claude Beauvillain,² Cécile Viollet,¹ Jacques Epelbaum,¹ and Claude Kordon¹

¹Unité de Recherches sur la Dynamique des Systèmes Neuroendocriniens, INSERM U159, Paris, France; and ²Unité de Recherche en Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale, INSERM U422, Lille Cedex, France

Growth hormone secretagogues (GHSs) act at distinct levels to control growth hormone (GH) secretion. At the pituitary level they reinforce or extend a tonic GH-releasing-hormone (GHRH)-induced activated state by mobilizing intracellular Ca^{2+} store. At the hypothalamic level GHS actions are more complex than originally anticipated. Chronic treatments with GHS result in loss of responsiveness to the secretagogues, an effect probably accounted for by indirect negative feedback of GHS stimulated plasma GH levels over GHRH release. Moreover, intracerebroventricular treatments with GHS can have paradoxical, inhibitory effects on GH secretion. Several mechanisms can account for such dual effects. GHS receptors were found to extend far beyond the arcuate nucleus and are mainly coexpressed by GHRH, somatostatin, and neuropeptide Y (NPY) neurons. Activation of GHRH neurons by GHS can be direct or indirect. Indeed using antisense strategy we found that *sst1* are physiological activators of arcuate GHRH neurons and we propose that activation of SRIH arcuate interneurons by GHS can increase GHRH neuron activity. Moreover, GHS can stimulate distinct populations of NPY neurons having opposite effects on GH secretion: arcuate NPY interneurons, act as indirect facilitators of GHRH release, whereas, on the contrary, a different subset of NPY neurons projecting to the periventricular hypothalamus (those also involved in mediating leptin effects on GH) seems able to activate SRIH release.

Key Words: Growth hormone secretagogues; somatostatin; neuropeptide Y; leptin, β -endorphin; arcuate nucleus.

Introduction

The physiology of growth hormone secretagogues (GHSs) is more complex than initially anticipated, when

growth hormone (GH)-releasing peptide or nonpeptide analogs were considered as simple activators of growth hormone-releasing hormone (GHRH) neurons (1,2) and, in synergy with GHRH, of pituitary somatotropes (3-5). Paradoxical effects of the secretagogues have now been observed, which seem to depend on the species, the duration, and the mode of administration (e.g., GHSs can inhibit GH after intracerebroventricular administration) (6). In addition, GHS targets are more diversified than formerly believed; recent cloning of the receptor (7) and subsequent *in situ* hybridization studies have shown that the receptor is expressed in several hypothalamic nuclei, as well as in other brain structures. Cloning of ghrelin (8), an endogenous ligand of GHS receptors (GHS-Rs) produced in the digestive tract and exhibiting neurohormone-like actions, has revealed that the GHS system is likely to have global peripheral and central effects.

Before analyzing major properties of hypothalamic neuronal networks involved in processing GHS information, we consider the pituitary mechanisms underlying GHS stimulation, because the pattern of somatotrope responses to hypothalamic inputs can contribute to the understanding of their regulation.

GHS Actions on the Pituitary

In addition to GHRH and somatostatin, the major regulators of pituitary growth hormone release, GHSs have been shown to stimulate GH release and to markedly potentiate the action of GHRH (3,9). Furthermore, GHRH is not able to release GH during troughs of episodic GH secretion, suggesting that its action can be completely antagonized by somatostatin, whereas GHSs can still elicit limited peaks of GH secretion under these conditions (Tannenbaum, personal communication). In parallel, reversal by somatostatin of GHRH-induced cyclic adenosine monophosphate (cAMP) accumulation in primary culture of pituitary cells is blunted by simultaneous addition of GHS.

The presence of GHS-R mRNA has been described in the pituitary of many species on the basis of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) or *in situ* hybridization studies (10,11). Their concentration seems to be species dependent, and to increase progressively during

Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed: Marie-Thérèse Bluet-Pajot, Unité de Recherches sur la Dynamique des Systèmes Neuroendocriniens, INSERM U159, 2ter rue d'Alésia, 75014 Paris, France. E-mail: bluetmt@broca.inserm.fr

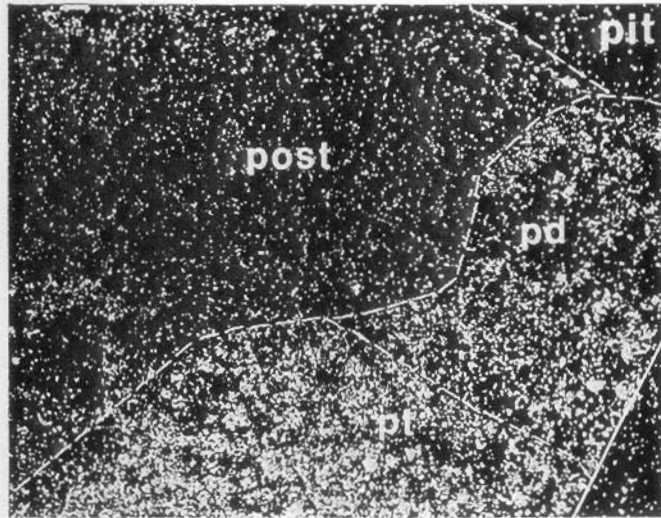


Fig. 1. Distribution of GHS-R mRNA in the Lemurian pituitary. Note the abundant expression and the important population of GHS-R-expressing cells. pd, pars distalis; pit, pituitary; post, posterior pituitary; pt, pars tuberalis.

development until puberty (12). The Lemurian pituitary, e.g., shows intense labeling extending to the anterior and intermediate lobes (Fig. 1). In the rat, all cells responding to GHSs have been identified as somatotropes (13). In humans, however, GHS-R mRNA has also been described in lactotropes and corticotropes, but only under pathologic conditions (14,15).

GHRH and somatostatin act by stimulating and inhibiting cAMP accumulation, respectively. Increased cAMP results in activation of voltage-dependent Ca^{2+} channels, a process that both triggers exocytosis of prestored GH containing granules and activates CREB, a cAMP-responsive transcription factor that induces expression of the GH gene (Fig. 2). The effects of GHRH stimulation and somatostatin inhibition are not entirely symmetrical. Somatostatin blocks GHRH-induced cAMP accumulation and GH exocytosis but is unable to reverse GHRH-induced CREB activation and GH gene expression. (If somatostatin did antagonize GHRH-induced GH gene expression, intermittent inhibition of GH biosynthesis by recurrent somatostatin release would probably not allow the pituitary to accumulate enough GH to release the large amounts of hormone—at least 20% of the gland's content—released within each secretory episode.)

Mechanisms Underlying GHS Potentiation of Pituitary GH Responses to GHRH

The addition of GHRH to somatotropes in culture results in long-lasting activation of the cells, as shown by the persistence of trains of spikes and Ca^{2+} oscillations for relatively long periods after the stimulus has been removed. Those persisting oscillations are interrupted by the addition of somatostatin but resume spontaneously as soon as somatostatin is washed out from the medium (16).

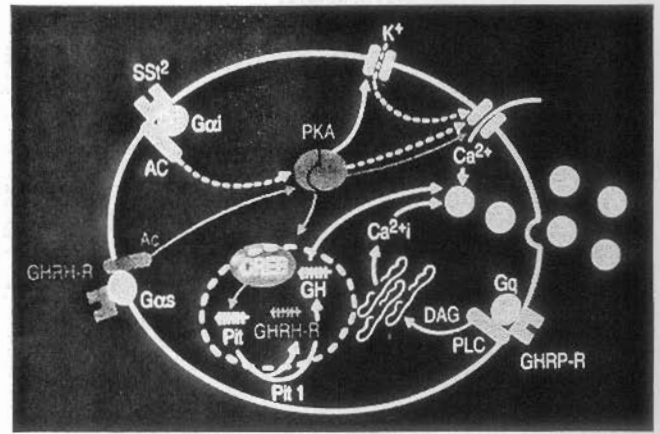


Fig. 2. Schematic representation of a pituitary somatotrope showing the mode of action and the partial antagonism of GHRH, GHSs, and somatostatin receptors. CREB, cAMP responsive transcription factor; DAG, diacylglycerol; Gai, ao, aq..., subsets of heterotrimeric G proteins; PLC, phospholipase C. Solid and broken lines refer to stimulatory and inhibitory intracellular pathways, respectively.

By contrast, GHSs do not affect directly trigger cAMP but activate a phospholipase C coupled to the GHS-R by an αq G-protein isotype. Their ionic mode of action on somatotropes exhibits a few differences with respect to that of GHRH: GHSs depolarize the membrane by a dose-dependent effect on Na^+ influx (17) and evoke Ca^{2+} oscillations and internal $[Ca^{2+}]_i$ mobilization (Fig. 3A). The latter effect is obtained only at higher doses of GHS and is sensitive to depletion of intracellular Ca^{2+} stores by thapsigargin, whereas the former is mainly observed at low doses of GHSs and is sensitive to protein kinase C (PKC) inhibitors and PKC depletion (18). Therefore, GHRH and GHSs can both activate voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels and evoke rhythmic Ca^{2+} entry, but only GHSs are able to induce internal $[Ca^{2+}]_i$ mobilization.

The addition of GHSs to somatotropes in culture further potentiates action potentials previously stimulated by GHRH and increase both their frequency and amplitude (Fig. 3B).

The following conclusions can be inferred from these data. First, somatostatin is the major pacemaker of GH episodic release, because it is required to silence somatotropes activated by intermittent, recurrent GHRH supply. Regular supply of GHRH can thus be considered a permissive condition, mostly concerned with maintaining somatotropes in an activated state in the absence of inhibitory somatostatin signals. The level of this activated state depends on the intensity and, possibly, the frequency of GHRH fluxes to the pituitary. Second, potentiation of GHRH by GHSs results from the additivity of their effects on Ca^{2+} activation, and from additional mobilization of $[Ca^{2+}]_i$ by GHSs. Furthermore, the Na^+ -dependent depolarizing effect of GHSs further sensitizes the cell toward additional depolarizing stimuli. By this mechanism, GHSs

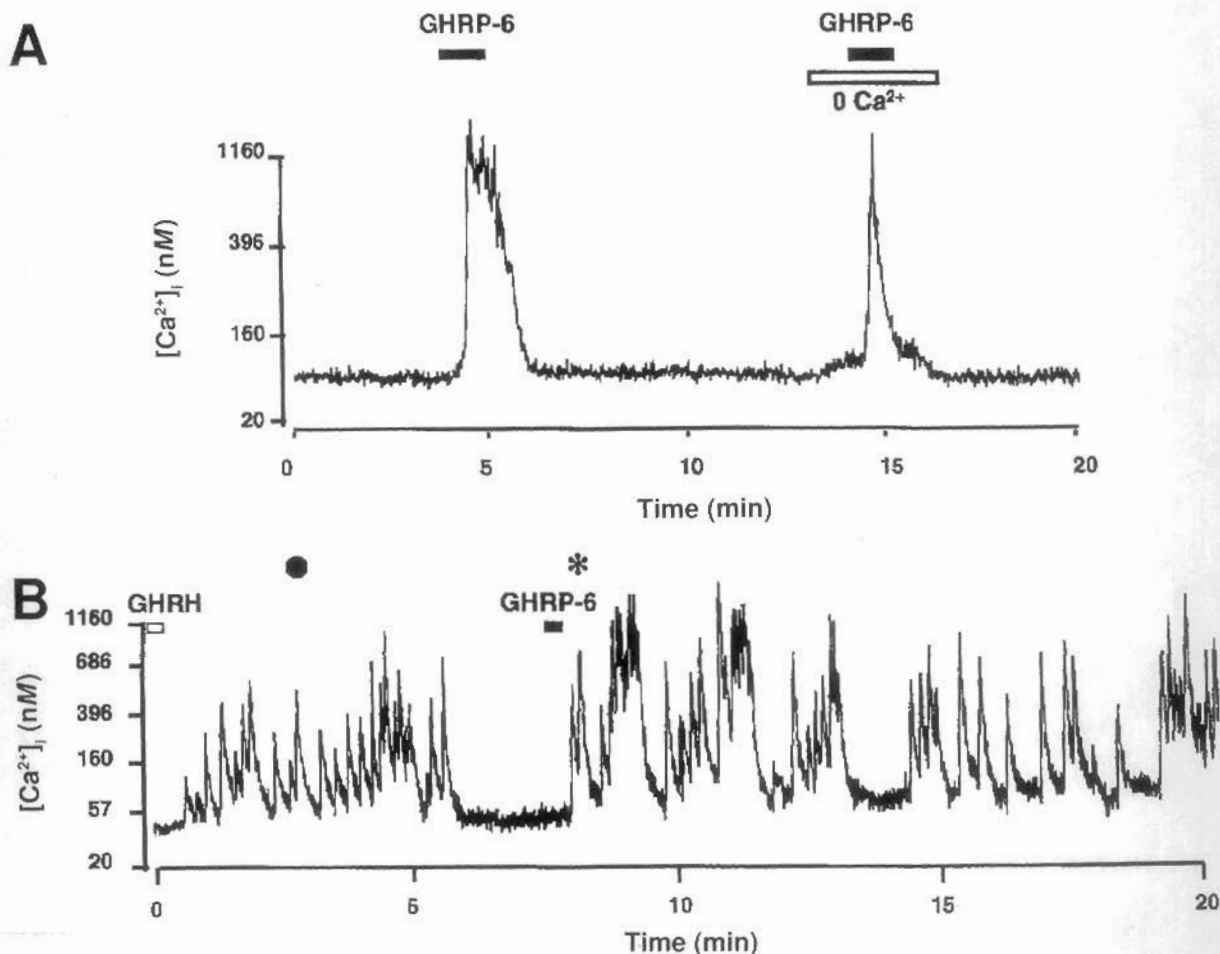


Fig. 3. (A) Application of GHRP-6 (100 nM, 1 min) evokes a biphasic response in somatotropes, with an initial peak of $[Ca^{2+}]_i$ followed by a plateau of oscillations. When applied in a calcium-free medium, only the peak response is preserved, suggesting that it results from release of internal Ca^{2+} stores. (B) Application of GHRH (30 nM, 40 s) triggers transient $[Ca^{2+}]_i$ oscillations (●). Subsequent application of GHRP-6 on the same cell evokes persistent bursts of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations (*).

can contribute to the enhancement of the GHRH-activated state of somatotropes. Third, incomplete reversal by somatostatin of GHS potentiation of GHRH-induced GH secretion probably results because only Ca^{2+} channel activation, but not $[Ca^{2+}]_i$ mobilization, can be reversed by somatostatin. In addition, potentiation of cAMP accumulation after combined GHRH/GHS treatments is likely to result, as in other cell models (19), from indirect adenylate cyclase stimulation by PKC or Ca^{2+} /calmodulin kinase, a process not mediated (as for somatostatin) by G α i proteins.

GHS Actions on Hypothalamic Networks

As already reviewed, the synergy between GHSs and GHRH—still controversial on GH release by somatotropes but well documented on activation of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in somatotropes—can be partly explained by GHS potentiation at the pituitary level. Stimulation of GHRH neurons by GHSs, a mechanism that was already postulated on the basis of early studies on GHS actions, accounts for the remaining part of that synergy.

The situation, however, is not as simple as suggested by the initial model of GHS action, which postulated that only GHRH neurons were targets of GHSs. After the GHS-R was cloned (7) and probes for *in situ* hybridization or PCR amplification synthesized, the distribution of GHS-R was found to extend far beyond the arcuate nucleus. In that structure, GHS-Rs are mainly coexpressed by neuropeptide Y (NPY) neurons (20), but also by GHRH and somatostatin neurons (21), as well as by a few β -endorphin neurons (22). In addition, GHS-Rs are abundant in the ventromedial nucleus, a structure involved in the regulation of food intake behavior, and in several other brain structures (23).

Analysis of the distribution of GHS-Rs, however, also reveals important species differences. For instance, GHS-Rs in the ventromedial nucleus are less abundant in primates than in rodents, and GHS-Rs are expressed in hypothalamic structures as supraoptic nuclei in mice but not in rats or other studied species.

The intricate diversity of arcuate neurons, however, seems to correspond to very strict articulation rules among them, which provide a limited leeway only for neuronal

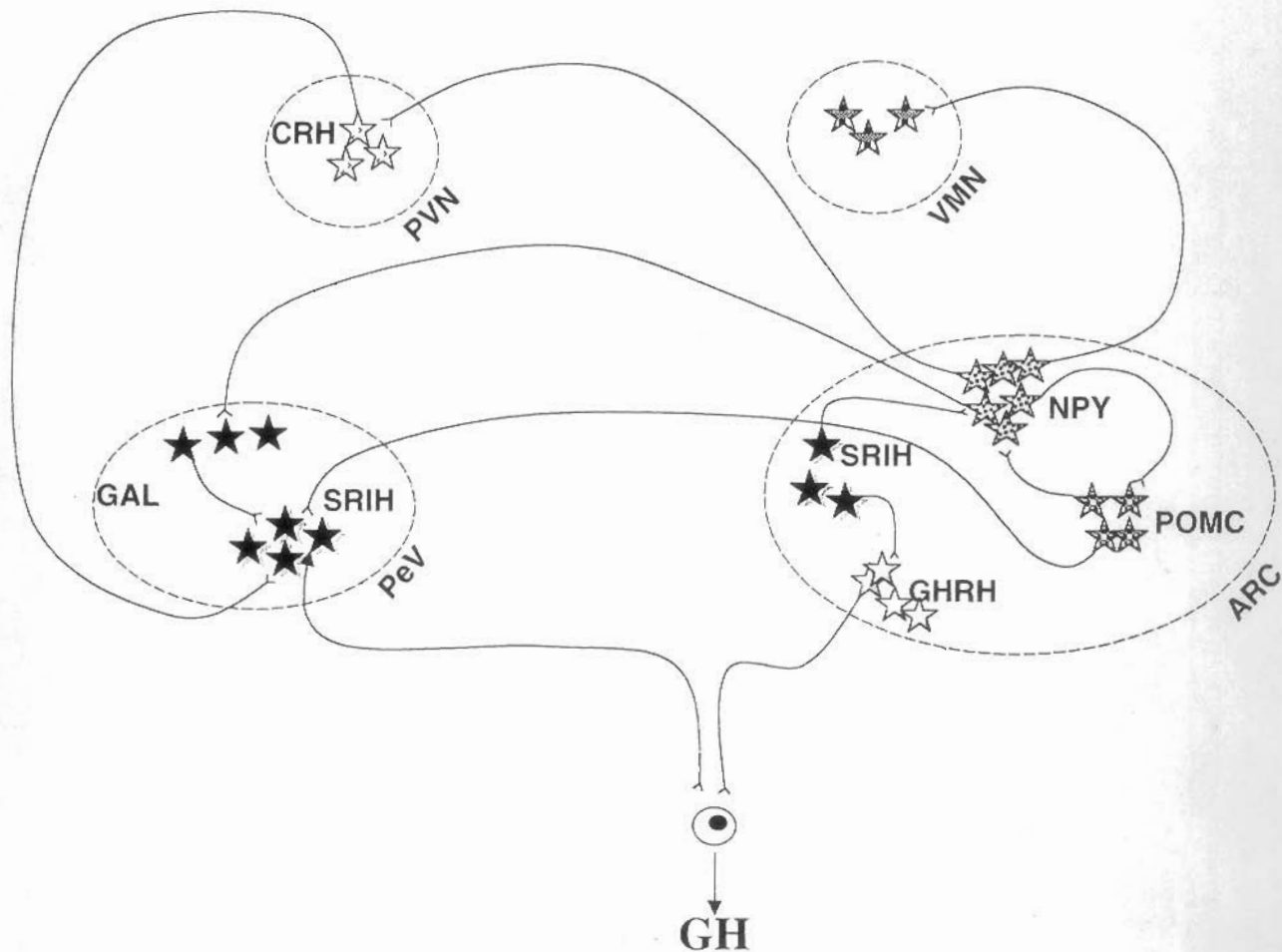


Fig. 4. Schematic representation of neuronal networks involved in GH regulation. ARC, arcuate nucleus; PeV, periventricular area; PVN, paraventricular nucleus; VMN, ventromedial nucleus; CRH, corticotropin-releasing hormone; GAL, galanin; NPY, neuropeptide Y; POMC, proopiomelanocortin; SRIH, somatostatin.

interactions. Most GHRH neurons project to the median eminence but do not seem to provide a significant innervation to other arcuate neurons (24). In addition to GHS-Rs (21), they express *sst1* and *sst2* somatostatin receptors (each subtype being present in about 15% of GHRH cells) (25) but are not directly innervated by either NPY neurons or from the major population of somatostatin neurons present in the periventricular hypothalamus (their major somatostatin input is owing to local, intraarcuate somatostatin interneurons).

Neuroanatomy of Arcuate Connections

Within the arcuate nucleus, NPY neurons themselves seem to project only to other NPY neurons (homologous NPY/NPY interactions) and to proopiomelanocortin neurons; these two targets have been shown to express distinct NPY receptor subtypes (Y1 for the homologous connections and Y2 for the other) (26). In addition, they project to the ventromedial nucleus and to the periventricular area, where they seem able to affect hypophysiotropic somatostatin neurons (either directly or via galanin neurons).

Two distinct populations of NPY neurons are involved, the first in relaying leptin inputs to the hypothalamus (leptin strongly inhibits NPY synthesis in these neurons, a prerequisite for both anorexigenic and GH stimulatory effects of leptin, [27]), and the second in relaying GHS inputs (20). Expression of leptin and GHS-Rs on arcuate NPY neurons shows very little overlap (28). In parallel, NPY neurons expressing GHS and leptin receptors exhibit distinct projection territories; many arcuate leptin-containing neurons project to the paraventricular nucleus, whereas GHS-containing neurons do not (29). Figure 4 presents a schematic representation of the area covered by GHS-Rs and of projections of corresponding neurons.

Physiologic responses to GHSs do not fit a simple model of univocal GHRH neuron stimulation. At the level of the central nervous system, GHSs are also able to trigger feeding behavior and to affect slow-wave sleep (30,31). For instance, GHSs are no longer able to stimulate GH release after sustained intracerebroventricular infusion (32). Under conditions of infusion of low GHRP-6 concentrations (10 nM), however, food intake behavior and body growth

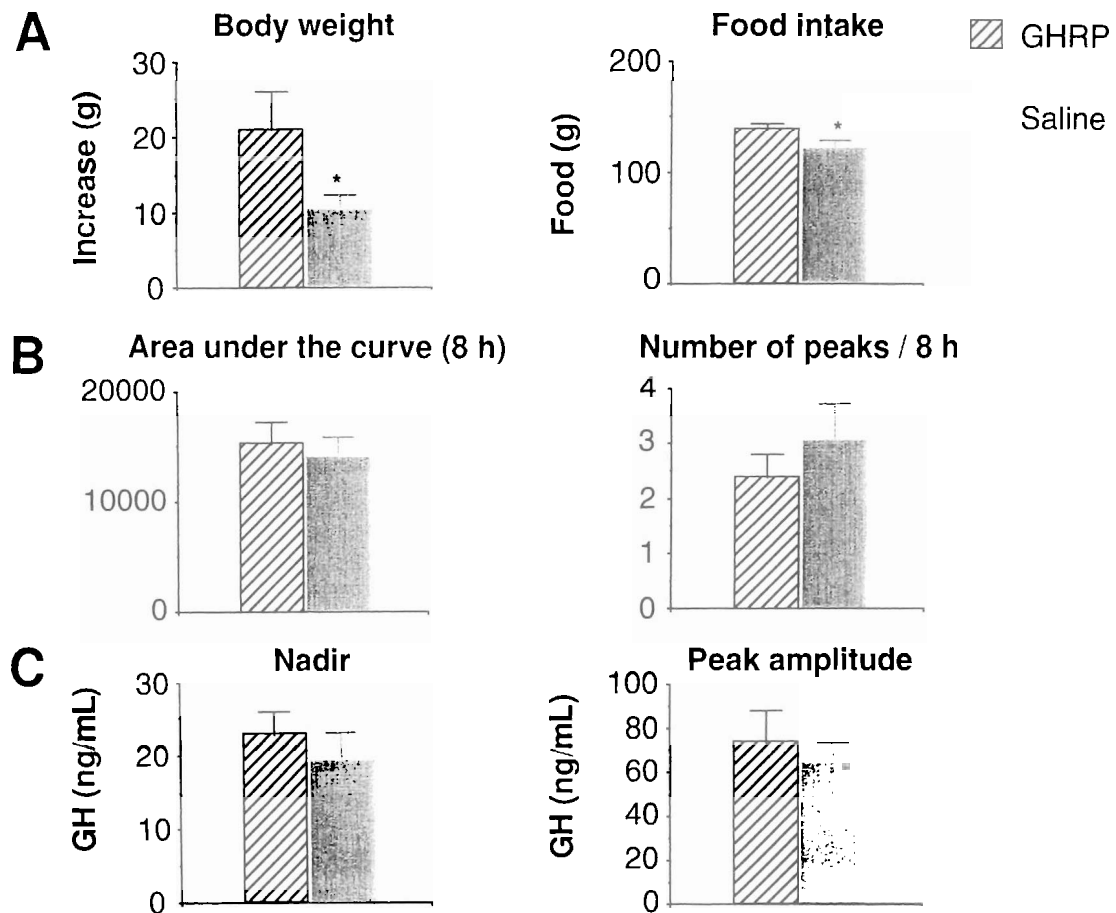


Fig. 5. Effect of a 6-d infusion of low concentrations of GHRP-6 (10 nM) on body growth, food intake (A) and GH secretion, (B,C) at the end of the treatment.

are still stimulated by GHS after 6 d, a time when GH is no longer stimulated by the secretagogue (Fig. 5). Persistence of growth stimulation thus seems independent of GH stimulation, an observation suggesting that progressive loss of GH stimulation under sustained administration of GHS does not only result from receptor desensitization. Other observations showing that intracerebroventricular administration of GHSs can result in a paradoxical inhibition of GH secretion (6) are not compatible with the simple model of GHRH stimulation by GHSs, and suggest that alternate mechanisms are involved, or at least that hypothalamic GH regulatory mechanisms can adapt to sustained GHS infusion and compensate the resulting GH overstimulation.

Animal Models Exhibiting Decreased GHS-R Activity

A comparable conclusion can be drawn from transgenic mice with an invalidated *sst2* receptor, a model that exhibits reduced GH feedback on hypothalamic neurons (33) as well as decreased hypothalamic GHS-R mRNA concentrations and blunted GH responses to GHSs (Fig. 6A,B). Nevertheless, the overall secretion of GH is not significantly

impaired in these animals, in spite of attenuated GHS inputs to the hypothalamus.

Taken together, these experiments confirm that normal GH pulsatility can be achieved in the absence of significant GHS inputs. Although compensating mechanisms that allow the GH oscillator to operate under these conditions are not yet fully understood, they are likely to involve complex feedback effects of GHSs on GHRH and somatostatin neurons.

Hypotheses to Account for the Paradoxical, Negative GH Responses to GHS

As expected from early experiments on GHS actions, the acute effects of GHSs first result in stimulation of GHRH neurons. By contrast, the negative actions of GHSs on the hypothalamic networks controlling GH release, such as those involved in GH inhibition after chronic treatment with GHS (34) or after their intracerebroventricular administration (6), are likely to involve another subset of NPY neurons, more directly concerned with the pituitary actions of leptin. These interactions are represented in Fig. 7; they involve, in particular, NPY neurons known to stimulate somatostatin release from periventricular somatostatin neu-

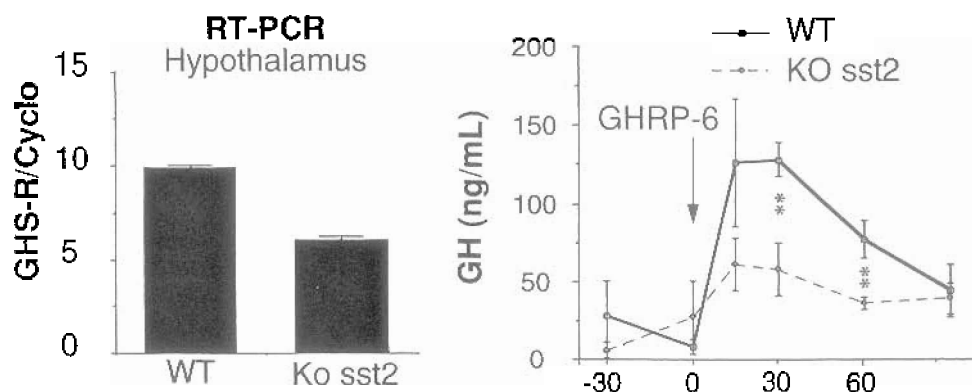


Fig. 6. GHS-R expression and responsiveness to GHSs in mice with an invalidated *sst2* receptor gene. (A) Semiquantitative assessment with respect to cycloheximide (cyclo) of GHS-R mRNA by RT-PCR in *+/+* and *-/-* mice; (B) concomitant responses to a standard dose of GHRP-6 (40 μ g).

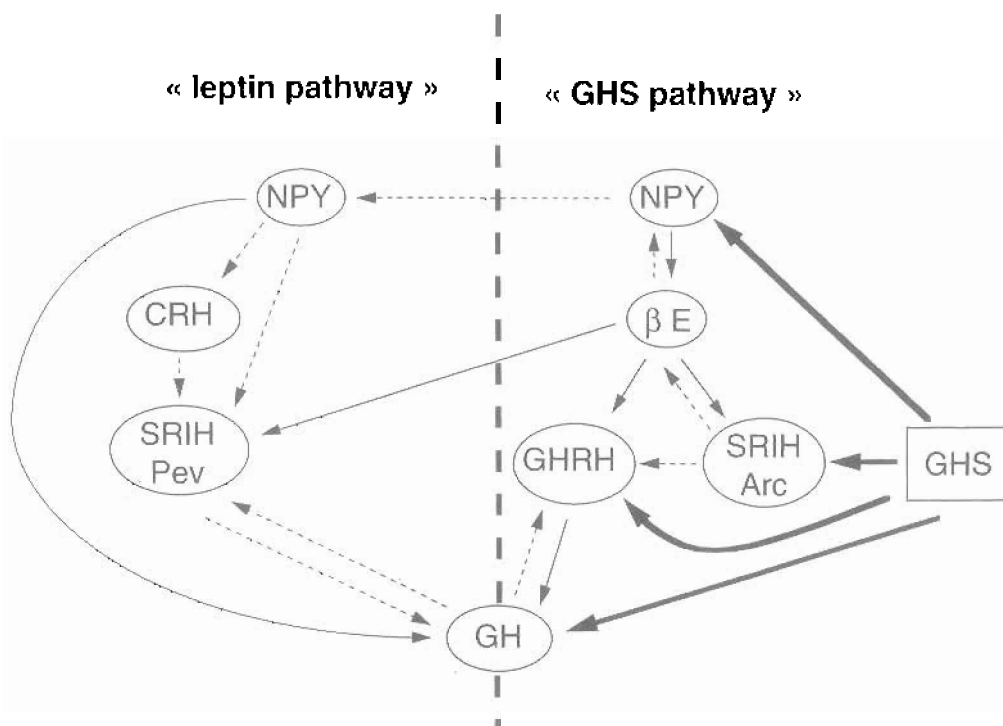


Fig. 7. Schematic representation of the dimorphic arcuate NPY neuronal population that may account for “paradoxical” GH responses to GHSs. Stimulatory effects of GHSs are mediated by both direct (through GHS-R expressed in somatotopes and in a subpopulation of the GHRH neurons themselves) and indirect (through NPY neurons influencing indirectly GHRH neurons via β -endorphin neurons) actions. This pathway, shown on the right, is labeled GHS pathway. A few arcuate somatostatin interneurons may also be involved. By contrast, negative effects of GHSs on GH are represented on the left, labeled leptin pathway. They involve NPY neurons more directly concerned with leptin regulatory pathways, which project to periventricular (PeV) somatostatin neurons and are able to trigger somatostatin release into the hypothalamo-hypophyseal portal system. Solid and broken lines represent putative stimulatory and inhibitory pathways, respectively.

rons, an interaction also observed under *in vitro* conditions (35). Activation by GHSs of this subset of NPY neurons is probably more indirect than that of NPY neurons of the leptin pathway; they may result from homologous NPY/NPY connections within the arcuate nucleus demonstrated by neuroanatomic studies (26).

One should also consider that both GHSs and leptin have been shown to exhibit dual effects on the electrical arcuate

neurons (36), an observation that may also account for some of their paradoxical effects on GH secretion. In addition, two other mechanisms can account for secondary, negative paradoxical effects of GHSs on GH secretion: GH feedback on hypothalamic neurons themselves and intra-arcuate somatostatin-GHRH connections.

GH itself has been shown to feed back on key regulatory neurons of GH-controlling hypothalamic networks (37).

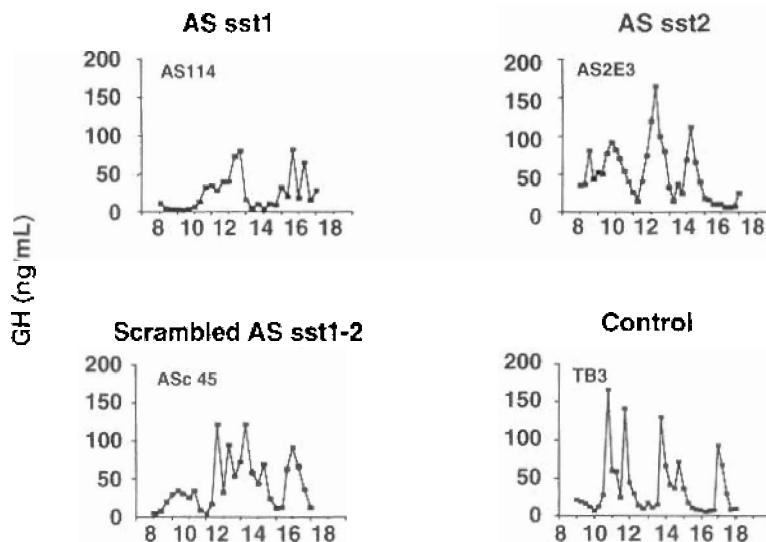


Fig. 8. Effect of intracerebroventricular infusion of oligonucleotides on GH pulsatility. Note that GH pulses are only impaired after sst1 antisense infusion. AS sst1/2, antisense directed against the receptor's messenger; scrambled AS, mixed scrambled oligonucleotides against both receptors.

GH levels are able to both turn off GHRH neurons and turn on periventricular and arcuate somatostatin neurons (33), the latter process itself able to inhibit GHS activation of its target in the arcuate nucleus (29,36,38). GH hyperstimulation resulting from chronic administration of GHSs can also be expected to shift the balance between GH stimulatory and inhibitory inputs in favor of the latter.

Additional Neuronal Involvement Downstream of GHS-Rs: Role of Somatostatin-GHRH Interactions

Arcuate somatostatin interneurons, also known to provide important inputs to GHRH neurons (which coexpress sst1 and sst2 somatostatin receptors) (25), could also be involved in paradoxical responses to GHS. Experiments based on intracerebroventricular infusion of selective receptor antisense oligonucleotides suggest that sst1 inputs to GHRH neurons are necessary for normal activation of GHRH (39). Infusion of an antisense sequence directed against sst1 mRNA strongly decreases GH pulse amplitude (Fig. 8), whereas sense oligonucleotides, or anti-sst2 antisense oligonucleotides are ineffective (Fig. 8). A likely consequence of this is that sst1-mediated, intraarcuate somatostatin inputs are necessary for appropriate operation of GHRH neurons. Under these conditions, disruption of sst1-mediated inputs is likely to impair recurrent firing of GHRH neurons and, subsequently, result in lowered maintenance of the somatotropic tone.

Although indirectly documented by several experimental data, the aforementioned explanations are still hypothetical. Their validation should now be made easier by the identification of endogenous ligands to the GHS-R, which will address more directly the problem of the physiologic relevancy of endogenous stores of the secretagogue.

Conclusion

GHSs seem to act as modulators of GH control mechanisms rather than as straightforward secretagogues. Neuronal networks on which their modulatory action is exerted include in-built, self-control systems, compensating potential overstimulation (resulting, e.g., from chronic GHS supply) by attenuating other positive inputs to GH release, or increasing the relative importance of negative inputs.

GHS modulations can be observed at various levels: on somatotrope cells, on which they reinforce or extend a tonic GHRH-induced activated state; and at the level of GH feedback, during which GHS receptors desensitize, at least in the pituitary, in order to limit the risk of overstimulation. Together with other mechanisms, in particular changes in the basal somatostatin activity over time, they play a role in age-dependent decreased GH activity.

Interestingly, some effects of GHSs overlap with those of leptin; variations in GH secretion levels are able to interfere with serum leptin levels (40) and leptin receptor gene expression (41). The role of GHSs, as that of leptin, is probably more global than the one that can be inferred from GH and food intake behavior modulation. Both hormones are involved in overall coordination of complex functions, of which GH regulation represents only one aspect. Leptin primarily specializes in adapting growth, as well as growth and reproductive hormones, to the availability of food. This role even predominates in nonmammalian vertebrates, in which growth can be suspended or markedly delayed during food shortage periods, an observation suggesting that leptin is more likely to have been selected as an adaptive mechanism against food shortages rather than as a hormone of satiety (an evolutionary link resulting in a leptin-dependent thrifty behavior (42)). Leptin is also important for

adapting metabolic functions to food availability, through metabolic rather than growth promoting actions of GH, and has been assumed to play a specific role during pregnancy, for maternal nutrient partitioning and optimization of fetal growth (43).

By contrast, temporal variations in the intensity of the GH response to GHSs suggest that activation of endogenous GHSs may have particular importance for a fine modulation of GH requirements at the time of puberty (44). In addition, the secretagogues are probably of physiologic relevance throughout the growth period of young animals, a role that should soon be confirmed when tools become available to measure variations in endogenous GHS ligands.

References

- Guillaume, V., Magnan, E., Cataldi, M., Dutoir, A., Sauze, N., Renard, M., Razafindrala, H., Contedevolx, B., Deghenghi, R., Lenaerts, V., and Oliver, C. (1994). *Endocrinology* **135**, 1073-1076.
- Conley, L. K., Teik, J. A., Deghenghi, R., Imbimbo, B. P., Giustina, A., Locatelli, V., and Wehrenberg, W. B. (1995). *Neuroendocrinology* **61**, 44-50.
- Bowers, C. Y., Reynolds, G. A., Durham, D., Barrera, C. M., Pezzoli, S. S., and Thorner, M. O. (1990). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**, 975-982.
- Elias, K. A., Ingle, G. S., Burnier, J. P., Hammonds, R. G., McDowell, R. S., Rawson, T. E., Somers, T. C., Stanley, M. S., and Cronin, M. J. (1995). *Endocrinology* **136**, 5694-5699.
- Cheng, K., Chan, W. W., Barreto, A., Jr., Convey, F. M., and Smith, R. G. (1989). *Endocrinology* **124**, 2791-2798.
- Yagi, H., Kaji, H., Sato, M., Okimura, Y., and Chihara, K. (1996). *Neuroendocrinology* **63**, 198-206.
- Howard, A. D., Feighner, S. D., Cully, D. F., et al. (1996). *Science* **273**, 974-977.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999). *Nature* **402**, 656-660.
- Cordido, F., Penalva, A., Dieguez, C., and Casanueva, F. F. (1993). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **76**, 819-823.
- Kamegai, J., Wakabayashi, I., Miyamoto, K., Unterman, T. G., Kineman, R. D., and Frohman, L. A. (1998). *Neuroendocrinology* **68**, 312-318.
- Kineman, R. D., Kamegai, J., and Frohman, L. A. (1999). *Endocrinology* **140**, 3581-3586.
- Kamegai, J., Wakabayashi, I., Kineman, R. D., and Frohman, L. A. (1999). *J. Neuroendocrinol.* **11**, 299-306.
- Bresson-Bepoldin, L. and Dufy-Barbe, L. (1994). *Cell Calcium* **15**, 247-258.
- de Keyser, Y., Lenne, F., and Bertagna, X. (1997). *Eur. J. Endocrinol.* **137**, 715-718.
- Barlier, A., Zamora, A. J., Grino, M., Gunz, G., Pellegrini-Bouillier, I., Morange-Ramos, I., Figarella-Branger, D., Dufour, H., Jaquet, P., and Enjalbert, A. (1999). *J. Neuroendocrinol.* **11**, 491-502.
- Kwecien, R., Tseeb, V., Kurchikov, A., Kordon, C., and Hammond, C. (1997). *J. Physiol. (Lond.)* **499**, 613-623.
- Kato, M., and Sakuma, Y. (1999). *J. Neuroendocrinol.* **11**, 795-800.
- Bresson-Bepoldin, L. and Dufy-Barbe, L. (1996). *J. Neuroendocrinol.* **8**, 309-314.
- Bihoreau, C., Heurtier, A., Enjalbert, A., Corvaia, N., Bensusan, A., Degos, L., and Kordon, C. (1991). *Eur. J. Immunol.* **21**, 2877-2882.
- Dickson, S. L. and Luckman, S. M. (1997). *Endocrinology* **138**, 771-777.
- Tannenbaum, G. S., Lapointe, M., Beaudet, A., and Howard, A. D. (1998). *Endocrinology* **139**, 4420-4423.
- Robinson, I. C. (1997). *Acta Paediatr. Suppl.* **423**, 88-91.
- Guan, X. M., Yu, H., Palyha, O. C., McKee, K. K., Feighner, S. D., Sirinathsinghji, D. J., Smith, R. G., Van der Ploeg, L. H., and Howard, A. D. (1997). *Brain Res. Mol. Brain Res.* **48**, 23-29.
- Dickson, S. L., Doutrelant-Viltart, O., Dyball, R. E., and Leng, G. (1996). *J. Endocrinol.* **151**, 323-331.
- Tannenbaum, G. S., Zhang, W. H., Lapointe, M., Zeitler, P., and Beaudet, A. (1998). *Endocrinology* **139**, 1450-1453.
- Broberger, C., Landry, M., Wong, H., Walsh, J. N., and Hokfelt, T. (1997). *Neuroendocrinology* **66**, 393-408.
- Vuagnat, B. A., Pierroz, D. D., Lalaoui, M., Englaro, P., Pralong, F. P., Blum, W. F., and Aubert, M. L. (1998). *Neuroendocrinology* **67**, 291-300.
- Luckman, S. M., Rosenzweig, I., and Dickson, S. L. (1999). *Neuroendocrinology* **70**, 93-100.
- Bailey, A. R., Giles, M., Brown, C. H., Bull, P. M., Macdonald, L. P., Smith, L. C., Smith, R. G., Leng, G., and Dickson, S. L. (1999). *Neuroendocrinology* **70**, 83-92.
- Copinschi, G., Leproult, R., Van Onderbergen, A., Caufriez, A., Cole, K. Y., Schilling, L. M., Mendel, C. M., De Lepelcure, J., Bolognese, J. A., and Van Cauter, E. (1997). *Neuroendocrinology* **66**, 278-286.
- Frieboes, R. M., Murck, H., Maier, P., Schier, T., Holsboer, F., and Steiger, A. (1995). *Neuroendocrinology* **61**, 584-589.
- Conley, L. K., Gaillard, R. C., Giustina, A., Brogan, R. S., and Wehrenberg, W. B. (1998). *J. Endocrinol.* **158**, 367-375.
- Zheng, H., Bailey, A., Jiang, M. H., Honda, K., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Van der Ploeg, L. H., Schaeffer, J. M., Leng, G., and Smith, R. G. (1997). *Mol. Endocrinol.* **11**, 1709-1717.
- Rahim, A., O'Neill, P. A., and Shalet, S. M. (1998). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 1644-1649.
- Korbonits, M., Little, J. A., Forsling, M. L., Tringali, G., Costa, A., Navarra, P., Trainer, P. J., and Grossman, A. B. (1999). *J. Neuroendocrinol.* **11**, 521-528.
- Hewson, T., Lone, N., Moore, M., and Howie, S. (1999). *Immunol. Cell. Biol.* **77**, 289-303.
- Pellegrini, E., Bluet-Pajot, M. T., Mounier, F., Bennett, P., Kordon, C., and Epelbaum, J. (1996). *J. Neurosci.* **16**, 8140-8148.
- Bailey, A. R., Smith, R. G., and Leng, G. (1998). *J. Neuroendocrinol.* **10**, 111-118.
- Lanneau, C., Bluet-Pajot, M. T., Zizzari, P., Csaba, Z., Dournaud, P., Helboe, L., Hoyer, D., Pellegrini, E., Tannenbaum, G. S., Epelbaum, J., and Gardette, R. (2000). *Endocrinology* **141**, 967-979.
- Janssen, Y. J., Frolich, M., Deurenberg, P., and Roelfsema, F. (1997). *Eur. J. Endocrinol.* **137**, 650-654.
- Cai, A. and Hyde, J. F. (1998). *Endocrinology* **139**, 420-423.
- Flier, J. S. (1998). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 1407-1413.
- Holness, M. J., Munns, M. J., and Sugden, M. C. (1999). *Mol. Cell. Endocrinol.* **157**, 11-20.
- Bellone, J., Aimaretti, G., Bartolotta, E., Benso, L., Imbimbo, B. P., Lenhaerts, V., Deghenghi, R., Camanni, F., and Ghigo, E. (1995). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 1090-1094.