

La ghréline : une hormone gastrique impliquée dans la régulation de la croissance et de l'appétit

Alexandra Labarthe et Virginie Tolle

UMR-S 894 INSERM, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 2 ter rue d'Alésia, 75014 Paris, France

Auteurs correspondants : Virginie Tolle, virginie.tolle@inserm.fr
Alexandra Labarthe, alexandra.labarthe@hotmail.fr

Reçu le 16 novembre 2016

Résumé – La ghréline est une hormone peptidique acylée de 28 acides aminés issue du tractus gastro-intestinal. Elle a initialement été identifiée comme le ligand endogène du GHS-R1a (*Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a*) et pour son puissant effet sécrétagogue de l'hormone de croissance (GH). La ghréline est également un facteur orexigène et adipogène qui participe à la régulation à long terme de l'homéostasie énergétique. Ainsi, cette hormone apparaît comme un facteur clé dans la régulation de fonctions essentielles à la vie au carrefour entre nutrition, métabolisme et croissance. Toutefois, le rôle du système ghréline/GHS-R dans la physiologie de la croissance, du comportement alimentaire et du métabolisme reste mal compris. L'utilisation complémentaire d'outils pharmacologiques ou de modèles animaux déficients pour le gène de la préproghréline, de l'enzyme d'acylation de la ghréline (*Ghrelin-O-acyl-transferase*, GOAT) ou du GHS-R dans des situations de dénutrition chronique ou de régime riche en graisses permet aujourd'hui de mieux appréhender le rôle de la ghréline dans la physiopathologie des troubles alimentaires et métaboliques.

Mots clés : Ghréline / croissance / comportement alimentaire / nutrition / anorexie mentale

Abstract – Ghrelin : a gastric hormone at the crossroad between growth and appetite regulation.

Ghrelin is a 28 amino acid peptide hormone synthesized within the gastrointestinal tract. Initially identified as the endogenous ligand of the GHS-R1a (*Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a*), ghrelin is a powerful stimulator of growth hormone (GH) secretion. At the crossroad between nutrition, growth and long-term energy metabolism, ghrelin also plays a unique role as the first identified gastric hormone increasing appetite and adiposity. However, the role of the ghrelin/GHS-R system in the physiology of growth, feeding behaviour and energy homeostasis needs to be better understood. Utilization of pharmacological tools and complementary animal models with deficiency in preproghrelin, ghrelin-O-acyl-transferase (GOAT - the enzyme that acylates ghrelin -) or GHS-R in situations of chronic undernutrition or high fat diet gives a more precise overview of the role of ghrelin in the pathophysiology of eating and metabolic disorders.

Key words: Ghrelin / growth / feeding behavior / nutrition / anorexia nervosa

Abréviations

AM	anorexie mentale
AgRP	<i>Agouti-Related Protein</i>
ARC	noyau arqué
DAG	ghréline désacylée
DIO	<i>Diet Induced Obesity</i>
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
GH	hormone de croissance
GHRH	<i>Growth Hormone Releasing Hormone</i>
GHRP-6	<i>GH Releasing Peptide-6</i>
GHS	GH sécrétagogues
GHS-R1a	<i>Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a</i>
GOAT	<i>Ghrelin-O-acyl-transferase</i>
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
MBOAT	<i>Membrane Bound-O-acyl transferase</i>
MBOAT-4	<i>Membrane Bound-O-acyl transferase-4</i>
NPY	neuropeptide Y
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
UCP2	<i>Uncoupling Protein 2</i>

La ghréline : découverte et effets biologiques d'une hormone gastrique à fort pouvoir orexigène

L'histoire de la ghréline est un des plus beaux exemples de pharmacologie inverse et débute à la fin des années 1970 avec la découverte de substances synthétiques capables de stimuler la sécrétion d'hormone de croissance (GH) en activant un récepteur non identifié. À la recherche d'analogues opiacés capables de moduler la libération des hormones hypophysaires à des doses physiologiques, Bowers *et al.* (1977) synthétisent la D-Trp2-metenképhaline, un dérivé de la met-enképhaline qui ne présente plus d'activité opiacée, mais est capable de stimuler spécifiquement 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, baptisé *GH Releasing Peptide-6* (GHRP-6) qui, lui, stimule la sécrétion de GH à la fois *in vitro* et *in vivo* (Bowers *et al.*, 1984). Cet hexapeptide est le premier d'une grande famille : les GH sécrétagogues (GHS).

Le clonage du récepteur des GHS (Howard *et al.*, 1996), le GHS-R, sera suivi de l'identification, par pharmacologie inverse, de son ligand endogène, la ghréline (Kojima *et al.*, 1999). Toutefois, le système ghréline/GHS-R s'avère bien plus complexe qu'initialement anticipé et, malgré les efforts de recherche pour en comprendre les subtilités, nous sommes loin d'en avoir découvert tous les secrets. Dans cette revue, nous décrirons les fonctions « bien établies » et présenterons les nouveaux mécanismes de régulation de ce système.

Le GHS-R

Structure du GHS-R1a et voies de signalisation

Le GHS-R1a, isoforme fonctionnelle du récepteur, est un récepteur à sept domaines transmembranaires de 366 acides aminés, qui a été cloné en 1996 à partir d'une banque d'ADNc d'hypophysés porcines (Howard *et al.*, 1996) et dont la signalisation est relativement complexe (Pour revues, Castaneda *et al.*, 2010 ; Sivertsen *et al.*, 2013). La voie canonique activée par le GHS-R1a requiert son couplage à une protéine G_q, qui va stimuler la voie de transduction de la phospholipase C, le turnover des IP₃ et le recrutement de la PKC pour aboutir à une augmentation du calcium intracellulaire (Howard *et al.*, 1996 ; Kojima *et al.*, 1999 ; Korbonits *et al.*, 2004). Le GHS-R1a peut également interagir avec d'autres protéines G hétérotrimériques, G_s au niveau neuronal (Kohno *et al.*, 2003), G_i au niveau pancréatique (Dezaki *et al.*, 2007) et G_{12/13} (Sivertsen *et al.*, 2013). En outre, l'activation du GHS-R1a peut induire diverses voies de signalisation intracellulaire (pour revue Yin *et al.*, 2014). Ainsi, l'exploitation pharmacologique optimale du GHS-R1a reste encore limitée par une compréhension incomplète des mécanismes régissant son efficacité et sa sélectivité de signalisation. Toutefois, une telle diversité de signalisation ouvre potentiellement la voie pour l'élaboration de ligands synthétiques biaisés, c'est-à-dire activant sélectivement une voie de signalisation et produisant ainsi une distorsion du signal.

La régulation de l'activité ligand-dépendante du GHS-R1a nécessite une désensibilisation du récepteur. Ainsi, le GHS-R1a activé est rapidement internalisé par endocytose dans les puits recouverts de clathrine, après recrutement des β -arrestines (Camina *et al.*, 2004). Les mécanismes liés à l'extinction du signal du GHS-R1a semblent être des régulateurs importants de la sensibilité du récepteur à la ghréline, et par conséquence des effets biologiques de l'hormone (Chebani *et al.*, 2016).

Caractéristiques du GHS-R1a

Le GHS-R1a possède également des rôles physiologiques indépendants du ligand qui résultent d'une part de son activité constitutive et d'autre part, de sa capacité à s'hétéro-dimériser avec divers récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). Ces caractéristiques pourraient avoir des implications non négligeables pour le développement d'outils pharmacologiques (antagonistes, agonistes inverses) modulant l'activité de ce récepteur.

Activité constitutive du GHS-R1a

Les études *in vitro* montrent que le GHS-R1a a une forte activité constitutive : il peut signaler jusqu'à 50% de sa capacité maximale en l'absence de ligand (Holst *et al.*, 2003). La pertinence physiologique de cette activité indépendante du ligand a été mise en évidence *in vivo* chez le rat ainsi que chez l'Homme. Afin de caractériser *in vivo* chez le rat l'importance de l'activité constitutive du GHS-R1a, Peterson *et al.* (2009) ont utilisé une approche pharmacologique élégante consistant à administrer en continu pendant 6 jours chez l'animal un agoniste inverse sélectif du récepteur à l'aide de mini-pompes osmotiques. Les rats ainsi traités présentent une diminution significative de la prise alimentaire, du poids corporel et de l'expression hypothalamique de NPY (Neuropeptide Y), un peptide hypothalamique orexigène et d'UCP2 (*Uncoupling Protein 2*). Chez l'Homme, diverses mutations du GHS-R1a entraînant une abolition de son activité constitutive, sans altérer sa capacité de liaison à la ghréline, ont été identifiées et sont associées à une perturbation de la croissance et/ou une obésité (Wang *et al.*, 2004; Holst & Schwartz, 2006; Pantel *et al.*, 2006).

Formation de dimères exotiques

Des études récentes montrent que le GHS-R1a peut, *in vitro*, former des hétéro-dimères avec divers récepteurs à 7 domaines transmembranaires, ce qui provoque une modulation du signal, des modifications des cascades de signalisation intracellulaire ainsi que du trafic et de l'internalisation des protomères (Yin *et al.*, 2014; Wellman & Abizaid, 2015). Ainsi, parmi les partenaires centraux du GHS-R1a, on trouve les récepteurs dopaminergiques D₁ (Jiang *et al.*, 2006; Kern *et al.*, 2015) et D₂ (Kern *et al.*, 2012), le MC₃R (Rediger *et al.*, 2009, 2011), l'isoforme 5-HT_{2C} du récepteur à la sérotonine (Schellekens *et al.*, 2015) et le récepteur aux endocannabinoïdes CB1 (Wellman & Abizaid, 2015). Il semble également que le GHS-R1a et le sous-type 5 du récepteur à la somatostatine forment un hétéro-dimère au niveau des cellules β -pancréatiques (Park *et al.*, 2012).

Toutefois, dans les modèles cellulaires, la formation de dimères de récepteurs peut être artificiellement encouragée, d'autant que le GHS-R1a semble apprécier la proximité d'autres récepteurs (Schellekens *et al.*, 2013b). Ainsi, si l'existence d'hétéro-dimères fonctionnels est largement confirmée dans les études *in vitro*, leur pertinence physiologique doit encore être clairement démontrée. Quelques études ont montré l'interaction physique du GHS-R1a avec le MC₃R et les récepteurs dopaminergiques D₁ et D₂ *in/ex vivo* (Schellekens *et al.*, 2013a). Seules les études poussées

de Kern *et al.* (2012, 2015) ont permis de valider l'interaction fonctionnelle *in vivo* entre le GHS-R1a et les récepteurs dopaminergiques D₁ et D₂.

Le GHS-R1a, en tant que RCPG, représente une cible pharmacologique de choix. Toutefois, la complexité de sa physiologie a rendu la compréhension de son fonctionnement nécessaire pour le développement de molécules ciblant son activité constitutive ou encore pour moduler l'activité des dimères dans lesquels il serait potentiellement impliqué.

Localisation tissulaire et cellulaire du GHS-R1a

La présence de l'ARNm ou de la protéine du GHS-R1a a pu être mise en évidence chez le rongeur et chez l'Homme dans des structures en accord avec son implication dans la sécrétion de GH et la prise alimentaire. Toutefois le GHS-R est plus largement distribué, tant au niveau central que périphérique, suggérant des rôles dans un nombre important de fonctions biologiques.

Expression du GHS-R1a au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire

L'étude systématique par hybridation *in situ* de Zigman *et al.* (2006) a permis de cartographier les sites d'expression du GHS-R1a au niveau central chez le rat et la souris. Le GHS-R1a est très fortement exprimé au niveau hypothalamique (Korbonits *et al.*, 2004). Son expression est particulièrement importante dans le noyau arqué (ARC) (Zigman *et al.*, 2006). On le retrouve également dans d'autres noyaux hypothalamiques tels que les noyaux ventro-médian (VMH), dorso-médian (DMH), paraventriculaire (PVN) et supra-chiasmatique (SCN) (Zigman *et al.*, 2006). Au niveau cellulaire, des expériences de double marquage en hybridation *in situ* ont révélé que 25 % des neurones à GHRH du VMH et de l'ARC expriment le GHS-R1a (Tannenbaum *et al.*, 1998). Dans l'ARC, d'autres populations neuronales expriment également le GHS-R1a, à des degrés variables (Willesen *et al.*, 1999). Ainsi, 94 % des neurones orexigènes à NPY expriment ce récepteur mais seulement 8 % des neurones anorexigènes à POMC ; environ 30 % des neurones somatostatinerigiques expriment le GHS-R1a (Willesen *et al.*, 1999).

Au niveau périphérique, le GHS-R1a est principalement exprimé dans l'hypophyse. En utilisant un modèle de souris transgéniques exprimant le GHS-R1a couplé à l'eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*), Reichenbach *et al.* (2012) ont montré une expression du GHS-R1a prédominante dans les cellules somatotropes, les autres types cellulaires (lactotropes, corticotropes et gonadotropes) ne l'exprimant que de façon modeste.

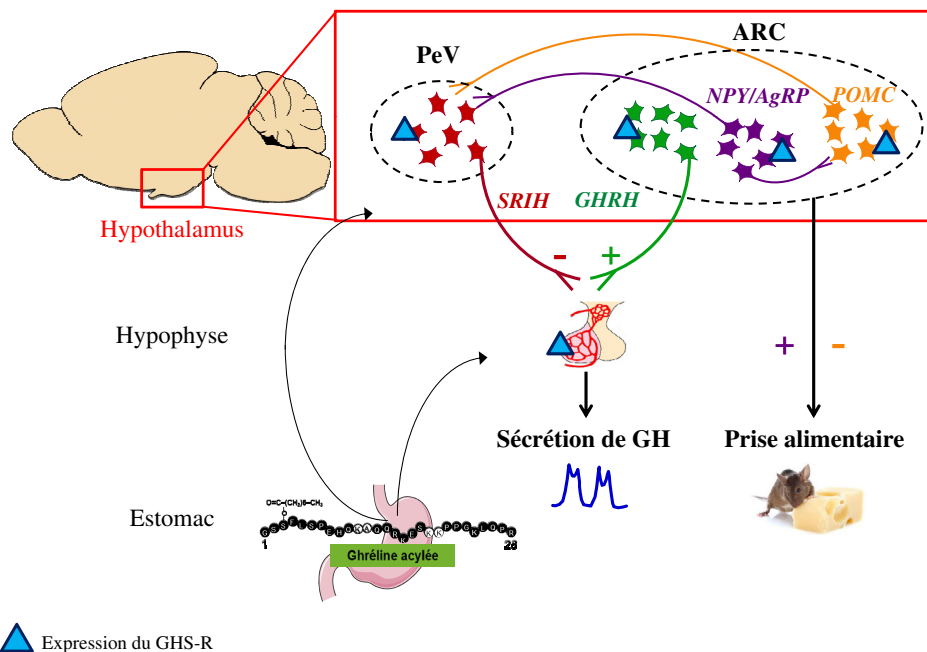


Fig. 1. La ghréline, une hormone au carrefour entre régulation de la croissance et de la prise alimentaire. PeV : Noyau périventriculaire hypothalamique, ARC : Noyau arqué hypothalamique, GHRH : *Growth Hormone Releasing Hormone*, SRIH : *Somatotropin Release Inhibiting Hormone*, NPY : *Neuropeptide Y*, AgRP : *Agouti-Related Transcript*, POMC : *Proopiomelanocortine*, GHS-R : *Growth Hormone Secretagogue Receptor*.

La ghréline : ligand endogène du GHS-R1a

Le ligand endogène du GHS-R1a ne fut isolé et purifié qu'en décembre 1999 par Kojima et collaborateurs à partir d'extraits d'estomacs de rat et nommé ghréline pour son puissant effet sécrétagogue de la GH (racine proto-indo-européenne *ghre-* pour « grandir » et suffixe *-relin* pour « *releasing substance* »). Toutefois au même moment, une autre équipe identifia par une approche différente une nouvelle protéine, à partir d'estomacs de souris ayant la même séquence que la ghréline de rat isolée par Kojima. Néanmoins, l'approche d'homologie de séquence entre des peptides et la motiline utilisée par Tomasetto *et al.* (2000) ne permettait pas de prédire la présence d'une éventuelle modification post-traductionnelle. En effet, la difficulté rencontrée pour identifier le ligand endogène du GHS-R1a réside dans le fait qu'il présente une modification post-traductionnelle particulière et unique, une acylation, qui est essentielle à sa liaison et à l'activation de son récepteur (van der Lely *et al.*, 2004).

Une hormone peptidique originale

La ghréline, une hormone acylée

La ghréline est une hormone peptidique de 28 acides aminés issue de la maturation post-transcriptionnelle

(Seim *et al.*, 2007) et post-traductionnelle (Hosoda *et al.*, 2003) d'un précurseur de 117 acides aminés, la préproghréline (Figure 1). Cette pro-hormone donne également naissance à l'obestatine, peptide qui sera décrit dans la section concernant les autres peptides dérivés de la préproghréline. Le gène codant pour la préproghréline a été cloné dans de nombreuses espèces et sa séquence est particulièrement bien conservée chez les mammifères (Tomasetto *et al.*, 2001; Angeloni *et al.*, 2004), suggérant un rôle physiologique important de la ghréline.

Deux formes de ghréline existent : la ghréline acylée et la ghréline désacylée. Ainsi, la ghréline subit une modification post-traductionnelle avec l'ajout d'un acide gras, généralement à 8 carbones (octanoylation), sur sa sérine en position 3 (Kojima *et al.*, 1999). Une telle modification est unique pour un peptide d'intérêt neuroendocrinien (Resh, 2016) et serait requise pour certaines activités biologiques de la ghréline puisque seule la ghréline acylée est capable de se lier au GHS-R1a et de l'activer. Toutefois, nous verrons plus loin que la ghréline désacylée possède également une activité biologique propre.

L'enzyme responsable de cette acylation appartient à la famille des *Membrane Bound-O-acyl transferase* (MBOAT) et a reçu deux noms, *Ghrelin-O-acyltransferase* (GOAT) ou *Membrane Bound-O-acyl*

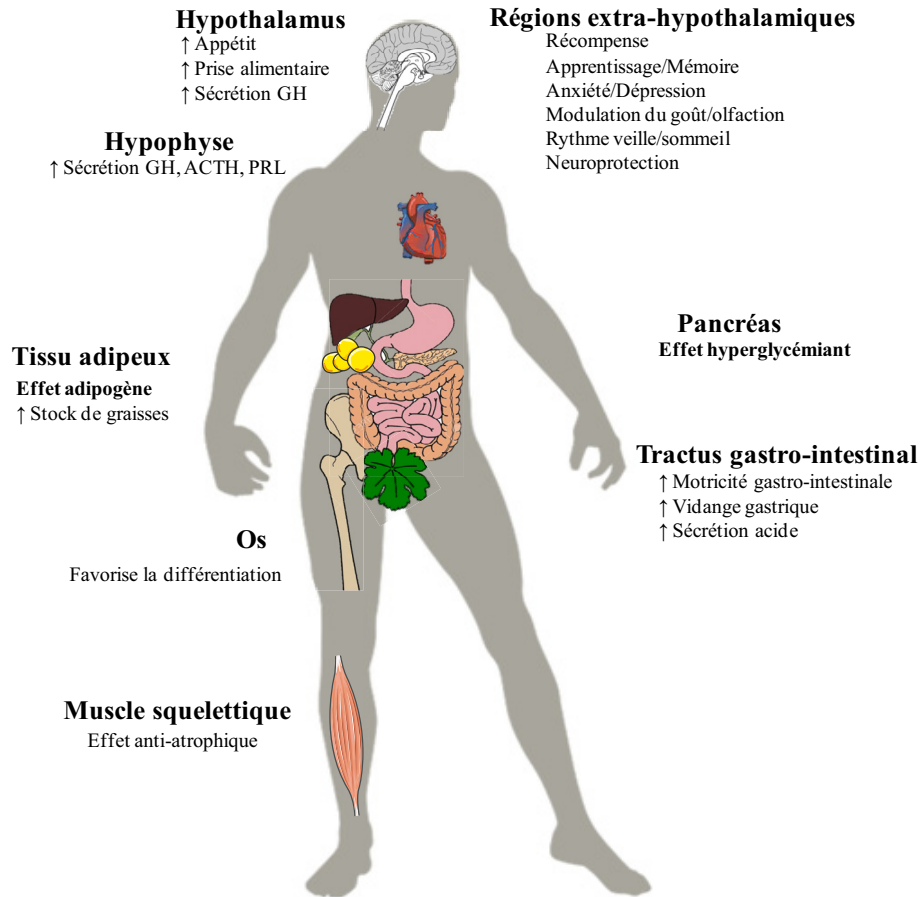


Fig. 2. Principaux effets biologiques de la ghréline acylée au niveau central et périphérique. Adapté de Bluet-Pajot *et al.*, 2005.

transferase-4 (MBOAT-4), puisqu'elle a été identifiée simultanément par deux équipes (Gutierrez *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). La GOAT est exprimée par un grand nombre de tissus exprimant également la ghréline (Lim *et al.*, 2011) mais est majoritairement retrouvée au niveau de l'estomac où elle colocalise avec la ghréline (Sakata *et al.*, 2009).

La ghréline acylée ne représente que 10 à 20 % de la ghréline plasmatique totale (Patterson *et al.*, 2005) et a une demi-vie relativement courte (10 min) (Tolle *et al.*, 2002), due à l'action rapide d'estérases qui la dégradent (Hosoda *et al.*, 2004). Ainsi, le dosage de la ghréline plasmatique nécessite des conditions de prélèvements sanguins et un traitement des échantillons plasmatiques favorisant la préservation de l'acylation.

Effets biologiques de la ghréline acylée

Initialement identifiée pour son puissant effet sécrétagogue de la GH, la liste des actions biologiques de la ghréline n'a cessé de s'allonger (Figure 2).

Ceci dit, certains de ces effets, notamment sur la prise alimentaire, avaient déjà été observés avec les GHS (Bowers *et al.*, 1991). À l'époque, ils avaient été attribués aux effets pharmacologiques. Ainsi, la ghréline est une hormone pléiotrope qui intervient dans la régulation de nombreuses fonctions neuroendocriniennes, métaboliques et extra-endocriniennes (van der Lely *et al.*, 2004). Si les fonctions de la ghréline apparaissent plus complexes qu'initialement imaginé, il semble que cette hormone joue un rôle de pivot entre croissance et métabolisme. Une des singularités de la ghréline réside également dans certaines de ses propriétés biologiques : elle est le premier facteur orexigène identifié au niveau du tractus gastro-intestinal et un régulateur à long-terme de l'homéostasie énergétique (Cummings *et al.*, 2005).

Ghréline et croissance

– Effet sur la sécrétion de GH

Dès sa découverte, Kojima et collaborateurs montrèrent que la ghréline stimule la sécrétion

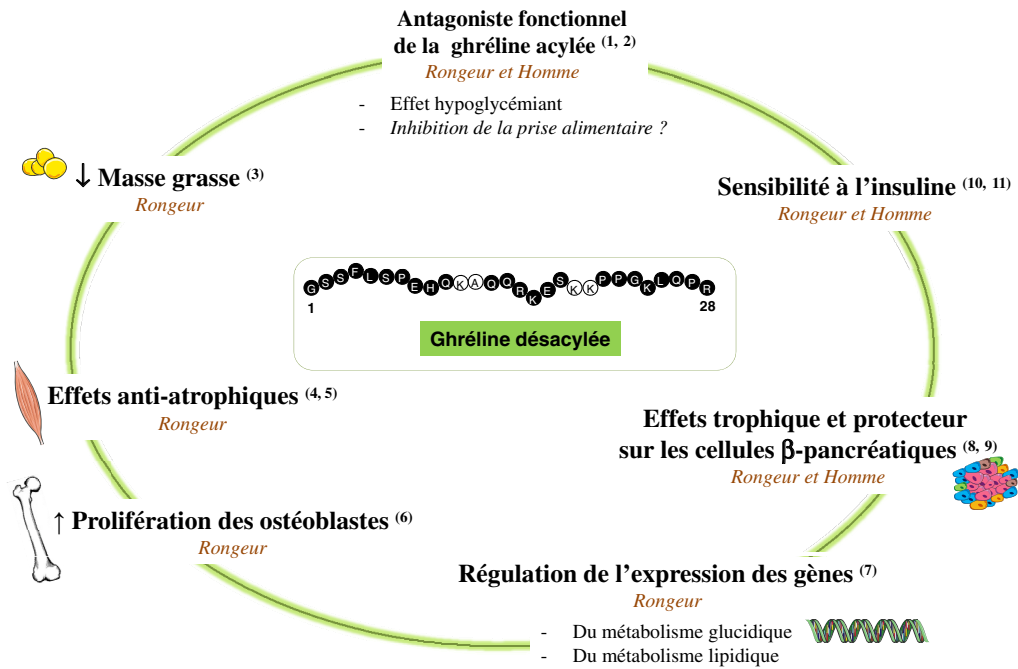


Fig. 3. Principaux effets biologiques de la ghréline désacylée.

¹Delhanty *et al.*, 2012 ; ²Broglia *et al.*, 2004 ; ³Asakawa *et al.*, 2005 ; ⁴Reano *et al.*, 2014 ; ⁵Porporato *et al.*, 2012 ; ⁶van der Velde *et al.*, 2008 ; ⁷Delhanty *et al.*, 2010 ; ⁸Granata *et al.*, 2010 ; ⁹Granata *et al.*, 2012 ; ¹⁰Delhanty *et al.*, 2011 ; ¹¹Benso *et al.*, 2012.

de GH aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* chez le rat anesthésié (Kojima *et al.*, 1999). Ces effets sur la libération de GH ont été confirmés chez des rats vigiles, après administration périphérique ou centrale de ghréline (Date *et al.*, 2000 ; Seoane *et al.*, 2000 ; Wren *et al.*, 2000 ; Tolle *et al.*, 2001).

La ghréline stimule la sécrétion de GH directement au niveau hypophysaire ainsi que *via* des actions hypothalamiques. De plus, l'activité stimulatrice de la ghréline ou des GH sécrétagogues sur la sécrétion de GH est plus importante sur des préparations hypothalamo-hypophysaires que sur des hypophyses seules (Clark *et al.*, 1989 ; Bowers *et al.*, 1991 ; Malozowski *et al.*, 1991). L'hypothalamus contrôle le rythme sécrétoire de la GH en libérant deux facteurs qui agissent directement au niveau de l'hypophyse de façon antagoniste : la GHRH (*Growth Hormone Releasing Hormone*) stimule la sécrétion de GH alors que la somatostatine (*Somatotropin Release Inhibiting Hormone*, SRIH) l'inhibe. L'effet de la ghréline sur la sécrétion de GH est en partie relayé par la modulation de l'activité des neurones à GHRH puisqu'il disparaît après immunisation passive avec un antiserum anti-GHRH (Tannenbaum *et al.*, 2003). De

plus, la ghréline est capable d'une part de stimuler la libération de GHRH à partir d'explants hypothalamiques (Wren *et al.*, 2002) et d'autre part, d'inhiber la libération de somatostatine à partir d'hypothalamus en périfusion (Tolle *et al.*, 2001). Deux études ont montré une action stimulatrice de la ghréline sur la décharge des neurones à GHRH (Osterstock *et al.*, 2010 ; Feng *et al.*, 2011), notamment *via* un contrôle de l'activité présynaptique GABAergique inhibitrice sur ces neurones. Contrairement à la GHRH, la ghréline est capable de stimuler la sécrétion de GH quel que soit le tonus somatostatinergique (Tolle *et al.*, 2001 ; Tannenbaum *et al.*, 2003).

Au niveau hypothalamique, la ghréline active également les neurones à NPY, neuropeptide impliqué dans l'inhibition de la sécrétion de GH (Rettori *et al.*, 1990) mais également dans la simulation de la prise alimentaire (Williams *et al.*, 2001).

Chez le rongeur, les données actuelles suggèrent que la ghréline serait plutôt un modulateur de l'amplitude de sécrétion de GH qu'un initiateur des pics de GH. En effet, l'administration d'un antagoniste spécifique du GHS-R1a chez le rat induit une diminution de l'amplitude des pics spontanés de GH

sans affecter leur fréquence (Zizzari *et al.*, 2005). D'autre part, la relation entre le rythme de sécrétion de GH et celui de la ghréline n'a pas été clairement établie (Tolle *et al.*, 2002). Chez l'Homme, une relation claire a été observée entre sécrétion de ghréline et de GH chez des sujets recevant des repas standardisés (Nass *et al.*, 2008), mais cette relation est abolie à la suite d'un jeûne.

– *Influence sur le métabolisme de l'os*

La gastrectomie s'accompagne d'une ostéopénie dans diverses espèces (Korbonits *et al.*, 2004), indépendamment d'une malabsorption des nutriments, vitamines et minéraux tels que le calcium et la vitamine D (Ma *et al.*, 2015). Ainsi, l'estomac produit au moins un facteur impliqué dans le remodelage osseux. La ghréline, par son effet GH sécrétagogue, apparaît être un candidat de choix. Il serait donc aisé d'imaginer que la ghréline intervienne sur la croissance et le remodelage osseux de manière secondaire, par l'intermédiaire de la GH et des facteurs de croissance comme l'IGF-1 produit par le foie sous l'effet de la GH. Toutefois, des études *in vitro* montrent que la ghréline intervient sur le métabolisme de l'os par une action directe, en régulant la différenciation des ostéoblastes mais sans affecter les ostéoclastes (Fukushima *et al.*, 2005; Maccarinelli *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). Les données *in vitro* et *in vivo* d'une étude récente (Ma *et al.*, 2015) indiquent que (1) le système ghréline/GHS-R1a régule l'accrétion plutôt que la résorption osseuse, (2) ce système affecte l'os trabéculaire sans affecter les paramètres corticaux, (3) les effets du système ghréline/GHS-R1a sur le remodelage osseux semblent être indépendants du système nerveux central. De manière générale, la ghréline et les GHS ont un impact positif sur le tissu osseux (van der Velde *et al.*, 2008).

Ghréline et régulation de l'homéostasie énergétique

La ghréline est impliquée dans la régulation du comportement alimentaire et module le métabolisme énergétique pour, *in fine*, promouvoir une balance énergétique positive.

– *Régulation du comportement alimentaire : un puissant facteur orexigène*

La ghréline se distingue des autres peptides gastro-intestinaux par son puissant effet orexigène lorsqu'elle est injectée de façon aiguë centralement ou en périphérie (Tschop *et al.*, 2000; Wren *et al.*, 2000). La stimulation de la prise alimentaire par la ghréline est principalement relayée au niveau central par les neurones à NPY/AgRP (Nakazato *et al.*, 2001) qui expriment fortement le GHS-R1a (Willesen *et al.*, 1999). L'administration de ghréline induit une activation de

ces neurones, détectable par l'augmentation (1) de l'immunoréactivité de type cFos, (2) de leur activité électrique et (3) de l'expression de NPY et d'AgRP (Briggs & Andrews, 2011). Toutefois, les circuits neuronaux en aval impliqués dans l'effet orexigène de la ghréline ne sont pas encore totalement élucidés. Les données disponibles indiquent qu'une partie des effets orexigènes de la ghréline implique de nombreux intermédiaires comme les mélanocortines, les orexines et la sérotonine (Cummings *et al.*, 2005). De plus, plusieurs groupes décrivent une action de la ghréline sur la prise alimentaire impliquant la voie vagale (Cummings *et al.*, 2005). Si la ghréline régule l'aspect homéostatique de la prise alimentaire, de nombreuses données montrent qu'elle est également impliquée dans son aspect hédonique (Abizaid *et al.*, 2006; Egecioglu *et al.*, 2010). En effet, la ghréline exerce de nombreuses actions extra-hypothalamiques (Andrews, 2011). En outre, la ghréline module le système de récompense en interagissant avec à la fois le système mésolimbique dopaminergique (Abizaid *et al.*, 2006) et le système des endocannabinoïdes (Edwards & Abizaid, 2016). Il semble que la ghréline augmente la valeur hédonique de la nourriture agréable au goût (Uchida *et al.*, 2013). Les tests de préférence alimentaire chez l'animal indiquent que l'administration de ghréline oriente la préférence alimentaire vers une nourriture agréable au goût riche en graisses (Shimbara *et al.*, 2004; Uchida *et al.*, 2013). Ces effets de la ghréline sur l'aspect hédonique de la prise alimentaire seraient en partie relayés par les neurones à orexine (Perello *et al.*, 2010). Il est donc plutôt clair que la ghréline stimule la prise alimentaire par le biais de différentes voies. Quant à déterminer laquelle de ces voies est la plus importante dans les effets orexigènes de l'hormone, de plus amples investigations sont nécessaires.

Le rythme de sécrétion de la ghréline suggère qu'elle participerait à la sensation de faim ainsi qu'à l'initiation des repas (Cummings *et al.*, 2005). En effet, la ghréline est sécrétée en anticipation des repas programmés chez le rat (Verbaeys *et al.*, 2011) de même que chez l'Homme (Cummings *et al.*, 2001, 2005). 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 suggérerait initialement un rôle de la ghréline dans la régulation de l'appétit et l'initiation des repas (Cummings *et al.*, 2004). Toutefois, cette augmentation semble être conditionnée par un rythme programmé des repas et pourrait jouer un rôle dans d'autres adaptations liées au repas. La ghréline est en effet impliquée dans des fonctions associées à l'initiation de la prise alimentaire comme l'olfaction (Tong *et al.*, 2011) ainsi que des comportements liés à la recherche de nourriture tels que l'éveil ou l'activité locomotrice

(Cummings, 2006). Notamment chez l'animal, le pic préprandial de ghréline coïncide avec l'augmentation de l'activité locomotrice en anticipation des repas programmés (Drazen *et al.*, 2006). Les études pharmacologiques chez le rat et le hamster montrent que l'administration de ghréline augmente les comportements de recherche de nourriture comme l'activité locomotrice (Uchida *et al.*, 2013) et l'éveil (Tolle *et al.*, 2002).

– Régulation du métabolisme énergétique

La sécrétion de ghréline varie en fonction des niveaux d'insuline, suggérant une régulation réciproque des hormones et une implication de la ghréline dans la régulation du métabolisme glucidique (Cummings *et al.*, 2005). Dans l'ensemble, les études chez le rongeur et chez l'Homme montrent que la ghréline est une hormone hyperglycémiant (Delhanty & van der Lely, 2011), ce qui peut être favorable ou délétère en fonction de la situation nutritionnelle et/ou métabolique considérée. En effet, chez la souris *ob/ob* obèse et diabétique, l'administration d'un antagoniste du GHS-R1a (Asakawa *et al.*, 2003) ou l'inactivation du gène codant pour la préproghréline (Sun *et al.*, 2006) améliore le contrôle glycémique en augmentant la sécrétion d'insuline induite par le glucose ainsi que la sensibilité à l'insuline. En revanche, les souris déficientes pour l'enzyme GOAT ou pour la préproghréline n'arrivent pas à maintenir leur glycémie lorsqu'elles sont soumises à une forte restriction calorique (Zhao *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012). Ces observations n'ont toutefois pas été systématiquement reproduites (Yi *et al.*, 2012). Chez l'Homme sain ou obèse, l'administration continue de ghréline pendant 65 minutes abolit la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Broglia *et al.*, 2001; Tassone *et al.*, 2003), détériore la tolérance au glucose (Tong *et al.*, 2011), stimule la production hépatique de glucose et induit une résistance hépatique et musculo-squelettique à l'insuline (Baragli *et al.*, 2011). L'ensemble de ces effets aboutit à une hyperglycémie.

Les autres peptides dérivés de la préproghréline : des modulateurs des effets biologiques de la ghréline ?

Si les rôles biologiques de la ghréline sont assez bien décrits, la contribution physiologique des autres peptides dérivés de la préproghréline reste difficile à établir. En effet, la ghréline désacylée et l'obestatine ne lient pas ni n'activent le GHS-R1a ; leurs récepteurs respectifs ne sont pas connus à ce jour, limitant le développement d'outils pharmacologiques pour tenter de décrypter leur pertinence physiologique. Toutefois, les études de ces dernières années tendent à leur accorder cette pertinence physiologique et indiquent que

ces peptides (1) possèdent des activités biologiques propres et (2) pourraient être des antagonistes fonctionnels de la ghréline acylée.

La ghréline désacylée

La ghréline désacylée (DAG) a longtemps été considérée seulement comme un produit de dégradation de la ghréline acylée (Kojima *et al.*, 1999), sans fonction biologique. Toutefois, ce peptide commence peu à peu à éveiller l'attention et se révèle être une entité métaboliquement active (Delhanty *et al.*, 2013). Dans l'ensemble, les études chez le rongeur et chez l'Homme s'accordent sur un rôle consistant de la DAG dans le métabolisme glucidique (Delhanty & van der Lely, 2011) puisque la DAG prévient l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline. De manière intéressante, les souris transgéniques sur-exprimant la DAG présentent une diminution significative du poids corporel, de la prise alimentaire et de la masse grasse, une légère diminution de la taille ainsi qu'une meilleure sensibilité à l'insuline (Asakawa *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008; Delhanty *et al.*, 2012). Enfin, l'administration d'un inhibiteur de la GOAT chez la souris sauvage provoque une diminution du poids corporel et une amélioration de la tolérance au glucose (Barnett *et al.*, 2010).

Chez l'Homme, les études cliniques indiquent que la DAG module de manière favorable le profil métabolique, principalement en antagonisant les effets diabétogènes de la ghréline acylée (Broglia *et al.*, 2004; Gauna *et al.*, 2004). En effet, il existe une relation positive entre sensibilité à l'insuline et DAG (Barazzoni *et al.*, 2007; Cederberg *et al.*, 2012) et l'administration intraveineuse de DAG chez des sujets sains ou diabétiques améliore la sensibilité à l'insuline (Delhanty & van der Lely, 2011; Benso *et al.*, 2012; Ozcan *et al.*, 2014). Les études *in vitro* suggèrent que la DAG agit directement sur les cellules β -pancréatiques pour promouvoir la sécrétion d'insuline et la survie cellulaire (Granata *et al.*, 2007; Delhanty *et al.*, 2010), par l'intermédiaire d'un récepteur encore inconnu (Callaghan & Furness, 2014). D'autre part, la modulation du métabolisme lipidique pourrait également participer aux effets insulino-sensibilisateurs de la DAG. En effet, la DAG affecte l'expression de groupes de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique dans les tissus métaboliquement actifs (tissu adipeux, foie et muscle squelettique) de souris déficientes pour le GHS-R1a (Delhanty *et al.*, 2010).

En dehors de ces actions métaboliques plutôt convaincantes, la DAG ne semble pas moduler les effets neuroendocrines de la ghréline acylée ni avoir

d'effet *per se* sur la sécrétion des hormones hypophysaires (Delhanty & van der Lely, 2011). En outre, les effets de la DAG sur la prise alimentaire n'ont pas donné de résultats concluants (Asakawa *et al.*, 2005; Inhoff *et al.*, 2008). Toutefois, des données chez le rat montrent que la DAG peut moduler la croissance et l'homéostasie énergétique par des actions centrales au niveau hypothalamique et du tronc cérébral (Stevanovic *et al.*, 2014). Dans une étude récente, l'utilisation de DAG fluorescente a permis de montrer que la DAG peut se lier à certaines populations de neurones du noyau arqué, dont les neurones à NPY, indépendamment du GHS-R1a (Fernandez *et al.*, 2016).

Enfin, il semble que la DAG exerce des actions directes sur l'os et le muscle squelettique (van der Velde *et al.*, 2008; Reano *et al.*, 2014). En effet, la DAG agit sur le remodelage osseux en favorisant la prolifération des ostéoblastes (van der Velde *et al.*, 2008; Reano *et al.*, 2014) mais sans affecter l'activité des ostéoclastes (Delhanty *et al.*, 2014). Des effets anti-atrophiques de la DAG ont également été décrits (Filigheddu *et al.*, 2007; Sheriff *et al.*, 2012; Porporato *et al.*, 2013).

L'obestatine

L'obestatine est un peptide de 23 acides aminés issu du clivage de la partie C-terminale de la préproghréline qui a été identifiée *in silico* quelques années après la ghréline (Zhang *et al.*, 2005). Ce peptide peut largement prétendre au titre de « peptide hautement controversé ». En effet, l'étude originelle de Zhang *et al.* montre que l'obestatine (nom dérivé de la contraction d'« obèse » et de « statine ») diminue la prise alimentaire et le poids corporel par l'intermédiaire d'un récepteur jusque-là orphelin, le GPR39. Toutefois, cette équipe n'a pas été en mesure de reproduire ces résultats (Zhang *et al.*, 2007). Certaines études ont confirmé le rôle du récepteur GPR39 dans la fonction gastro-intestinale et la régulation de l'homéostasie énergétique (Moechars *et al.*, 2006; Tremblay *et al.*, 2007) mais l'obestatine ne semble pas être son ligand endogène puisque sa liaison au récepteur n'a pu être confirmée (Lauwers *et al.*, 2006; Chartrel *et al.*, 2007; Holst *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Les découvertes contradictoires autour de l'obestatine ont donc remis en question la légitimité du peptide.

Concernant la prise alimentaire et la sécrétion de GH, l'obestatine ne semble pas avoir d'effet *per se* (Nogueiras *et al.*, 2007; Mondal *et al.*, 2008) mais agirait en modulant les effets orexigène et sécrétagogue de GH de la ghréline (Zizzari *et al.*, 2007). Les interactions ghréline/obestatine se produiraient principalement au niveau hypothalamique puisque l'activation

des neurones à GHRH et NPY induite par la ghréline est antagonisée par une co-administration d'obestatine (Hassouna *et al.*, 2012, 2016).

Certaines études suggèrent que l'obestatine ne serait pas uniquement un antagoniste fonctionnel de la ghréline mais serait également un peptide multifonctionnel avec des actions centrales et périphériques (Tang *et al.*, 2008; Seim *et al.*, 2011). Ainsi, l'obestatine pourrait agir sur des fonctions physiologiques telles que la régulation centrale du sommeil, de la mémoire, de l'anxiété et de la soif et la régulation périphérique du pancréas endocrine, du tissu adipeux, du système rénal et cardiovasculaire. Néanmoins, ces effets restent spéculatifs et les mécanismes d'action de l'obestatine largement inconnus.

Régulation de la ghréline et de ses peptides dérivés par l'état nutritionnel

Le statut nutritionnel est un régulateur important des niveaux de ghréline circulants. Il existe une corrélation négative entre l'indice de masse corporelle (IMC) et les concentrations plasmatiques de ghréline à jeun (Hansen *et al.*, 2002; Tolle *et al.*, 2003). Ainsi, les niveaux plasmatiques de ghréline fluctuent en fonction des variations aiguës et/ou chroniques de la balance énergétique.

Variation des taux de ghréline en fonction des variations aiguës du statut nutritionnel

Nous avons vu précédemment que les taux plasmatiques de ghréline augmentent en anticipation des repas, puis diminuent rapidement en période post-prandiale chez le rongeur (Toshinai *et al.*, 2001) comme chez l'Homme (Tschop *et al.*, 2001a). Cette suppression post-prandiale de la sécrétion de ghréline est proportionnelle à la teneur calorique de l'ingestat (Callahan *et al.*, 2004), mais dépend également de sa composition en nutriments (Korbonits *et al.*, 2004; Iwakura *et al.*, 2015; Zigman *et al.*, 2016).

Un jeûne court (24 ou 48 heures) s'accompagne chez le rongeur et chez l'Homme d'une élévation des concentrations de ghréline, qui résulte d'une augmentation de la fréquence des pics de sécrétion, de l'amplitude de ces pics (Bagnasco *et al.*, 2002) ainsi que de l'expression de la ghréline au niveau de l'estomac (Torsello *et al.*, 2003). L'expression hypothalamique du GHS-R1a est également sensiblement augmentée par le jeûne (Kim *et al.*, 2003; Nogueiras *et al.*, 2004). Cette adaptation hormonale orexigène et adipogène face à un déficit énergétique aigu pourrait être à l'origine du rebond alimentaire observé lorsque les animaux sont nourris à nouveau (Briggs *et al.*, 2013)

et/ou de l'augmentation des niveaux de GH induite par le jeûne chez l'Homme (Muller *et al.*, 2002). La renutrition rétablit les niveaux de ghréline chez l'animal et l'Homme.

S'il existe bien un contrôle à court terme de la sécrétion de ghréline, des modifications de la balance énergétique sur le long terme sont également associées à des changements de l'activité du système ghréline/GHS-R1a. En outre, les niveaux circulants de ghréline répondent aux variations des réserves énergétiques de l'organisme (Iwakura *et al.*, 2015), ce qui confère à l'hormone le rôle de signal d'adiposité, au même titre que l'insuline et la leptine (Cummings *et al.*, 2005). Toutefois, la variation des taux plasmatiques de ghréline serait plutôt liée aux apports alimentaires. Ainsi, les études cliniques chez l'Homme suggèrent que la ghréline est un bon marqueur du statut nutritionnel puisque les taux plasmatiques de l'hormone oscillent de manière opposée chez les sujets atteints d'AM ou d'obésité et après intervention nutritionnelle (Soriano-Guillen *et al.*, 2004).

Impact de la dénutrition chronique : cas de l'anorexie mentale (AM)

Dans les situations de dénutrition chronique, comme dans le cas de l'anorexie mentale, les niveaux de ghréline sont significativement augmentés chez les patients par rapport aux sujets sains non dénutris (Tolle *et al.*, 2003; Germain *et al.*, 2009, 2010). Malgré une élévation substantielle des taux plasmatiques de cette hormone orexigène, les patients atteints d'AM adoptent de manière paradoxale un comportement de restriction alimentaire. Cette observation a conduit plusieurs groupes à suggérer le concept de « résistance ou insensibilité » à la ghréline dans cette situation pathologique (Gorwood *et al.*, 2016). Cette hypothèse reflète l'incapacité de la ghréline à stimuler la prise alimentaire chez les patients atteints d'AM. L'origine de cette « résistance » centrale aux effets orexigènes de la ghréline n'est pas encore connue, mais elle pourrait être due à défaut de l'impact de la ghréline sur les neuro-circuits homéostatiques mais également sur le système de récompense cortico-mésolimbique lié aux processus émotionnels associés à la nourriture (Gorwood *et al.*, 2016). Selon une autre hypothèse, d'autres facteurs périphériques anorexigènes pourraient contrebalancer les taux élevés de ghréline chez les patients AM (Germain *et al.*, 2009, 2010).

Toutefois, il semblerait que l'hyperghrélinémie observée dans cette pathologie ne soit pas limitée à un état de résistance aux effets de la ghréline sur l'appétit ou la motivation face à l'aspect récompense de la nourriture. En effet, cette hyperghrélinémie pourrait également être une réponse hormonale adaptative à la

dénutrition chronique, et serait requise pour le maintien de la glycémie chez la souris soumise à une restriction calorique sévère (Zhao *et al.*, 2010).

Impact d'une balance énergétique positive

Chez l'animal rendu obèse par un régime riche en graisses (DIO, *Diet Induced Obesity*), plusieurs composantes du système ghréline/GHS-R1a sont altérées. En effet, on observe chez les souris DIO (Briggs & Andrews, 2011) :

- une forte diminution des niveaux plasmatiques de ghréline,
- une diminution de l'expression de la ghréline et de la GOAT au niveau de l'estomac,
- une diminution de l'expression hypothalamique du GHS-R1a,
- une diminution du transport de la ghréline au niveau de la barrière hémato-encéphalique.

Chez les souris obèses, l'administration périphérique aiguë ou chronique de ghréline ne stimule plus la prise alimentaire (Briggs & Andrews, 2011; Zigman *et al.*, 2016). De plus, le traitement par la ghréline de leurs explants hypothalamiques n'induit pas la sécrétion de NPY ou d'AgRP, par rapport aux explants hypothalamiques issus de souris témoins. Ainsi, le DIO provoque une résistance centrale à la ghréline, principalement au niveau des neurones hypothalamiques de l'ARC. En effet, l'administration intracérébroventriculaire (*icv*) de ghréline chez les souris DIO ne stimule plus l'activation de cFos au niveau de l'ARC, ni l'augmentation de l'expression de NPY et d'AgRP (Briggs *et al.*, 2010).

La résistance à la ghréline induite par le DIO ne se confine pas uniquement aux voies neuronales contrôlant la prise alimentaire. Le DIO affecte également l'effet GH sécrétagogue de la ghréline, tant au niveau central qu'hypophysaire. L'administration centrale de ghréline stimule fortement la sécrétion de GH chez les souris témoins, mais pas chez les souris DIO (Briggs *et al.*, 2010). L'absence d'effet GH sécrétagogue chez les souris DIO à la suite d'une administration *icv* de ghréline suggère que l'hormone ne serait plus capable d'activer les neurones à GHRH de l'ARC (Briggs & Andrews, 2011). La réponse GH à la ghréline est diminuée chez les animaux obèses (Iwakura *et al.*, 2007), ce qui pourrait être dû à la forte diminution de l'expression hypophysaire du GHS-R1a (Luque & Kineman, 2006; Iwakura *et al.*, 2007).

Chez les sujets obèses, les taux plasmatiques de ghréline sont significativement diminués par rapport aux sujets témoins (Tschop *et al.*, 2001b), et le pic de sécrétion avant un épisode de prise alimentaire est aboli (Yildiz *et al.*, 2004). L'hyposécrétion de ghréline

chez les sujets obèses pourrait être en partie responsable de la diminution de l'activité de l'axe somatotrope, mais des études montrent qu'il n'y a pas de lien de causalité entre ces deux paramètres (Lindeman *et al.*, 2002). Comme chez le rongeur, la réponse GH à la ghréline est diminuée chez les sujets obèses par rapport aux sujets témoins. Toutefois, bien que ces observations soient similaires à ce que l'on observe dans les modèles animaux, l'existence d'une résistance à la ghréline chez l'Homme obèse reste à démontrer (Zigman *et al.*, 2016).

Rôle endogène du système ghréline/GHS-R1a : approches pharmacologiques et génétiques

Utilisation d'outils pharmacologiques

Afin d'étudier le rôle du système ghréline/GHS-R1a dans la régulation de la sécrétion de GH et la prise alimentaire, plusieurs antagonistes ont été développés (Hassouna *et al.*, 2016). Bien que leurs mécanismes d'action au niveau du système nerveux central restent mal caractérisés, tous sont capables de bloquer la sécrétion de GH induite par la ghréline *in vitro* et *in vivo*. Ces composés ont également permis de confirmer que les effets de la ghréline sur la sécrétion de GH et la prise alimentaire sont indépendants. Par exemple, le composé BIM-28163 (renommé RM-28163) s'est révélé avoir des activités antagonistes et agonistes respectivement sur la sécrétion spontanée de GH et la prise alimentaire. Chez le rat, le traitement sous-cutané ou central pendant 48 h avec cet antagoniste sélectif du GHS-R1a réduit fortement l'amplitude des pics sécrétoires de GH (Zizzari *et al.*, 2005) alors qu'il stimule la prise alimentaire et l'augmentation du poids corporel (Halem *et al.*, 2005). Les effets orexigènes inattendus de cet antagoniste, également observés chez la souris, seraient relayés en partie par une activation des neurones à NPY au niveau hypothalamique (Hassouna *et al.*, 2013).

En outre, les propriétés du GHS-R1a rendent sa pharmacologie complexe. En effet, l'hétérodimérisation du GHS-R1a avec le récepteur dopaminergique D₂ est retrouvée dans les neurones hypothalamiques (Kern *et al.*, 2012). Chez les souris sauvages mais pas chez les souris invalidées pour le GHS-R1a, la cabergoline (agoniste dopaminergique) inhibe la prise alimentaire, indiquant que la combinaison avec le GHS-R1a est nécessaire pour l'activation du récepteur D₂. De plus, l'antagoniste sélectif du GHS-R1a JMV 2959 (Salome *et al.*, 2009) bloque

l'effet anorexigène de la cabergoline, suggérant que sa liaison au GHS-R1a change la conformation de ce dernier et par conséquent, la capacité de réponse du récepteur dopaminergique D₂. En revanche, lorsque le GHS-R1a s'hétérodimérise avec le récepteur à la sérotonine 5-HT_{2C} (Schellekens *et al.*, 2013b), ce dernier est moins sensible à la ghréline ou à l'agoniste ghrélinergique MK677.

Utilisation des modèles animaux déficients pour la ghréline, le GHS-R1a ou la GOAT

La manipulation génétique du système ghréline/GHS-R1a offre la possibilité d'étudier de manière différentielle le rôle des peptides dérivés de la préproghréline (invalidation du gène codant pour la préproghréline : *Ghrl*^{-/-}), le rôle plus spécifique de l'absence de ghréline acylée (invalidation du gène codant pour la GOAT : *Goat*^{f/-/-}) ou encore le rôle des effets de la ghréline relayés par son récepteur (invalidation du gène codant pour le GHS-R1a : *Ghs-r*^{-/-}) (Tableau 1). Il est à noter qu'il est relativement difficile d'isoler le rôle de chacun des composants de ce système. En effet les peptides dérivés de la préproghréline interagissent entre eux et ont des effets propres et nous avons vu plus haut dans cette revue les particularités du GHS-R1a. Ainsi, la présence du GHS-R1a chez les souris *Ghrl*^{-/-} et *Goat*^{-/-}, celle des peptides dérivés de la préproghréline chez les souris *Ghs-r*^{-/-} ou encore l'augmentation des niveaux de ghréline désacylée inhérente à l'invalidation de la GOAT peuvent en partie expliquer les différences phénotypiques (que nous allons présenter) observées dans les différents modèles. La synthèse et le recoupement des résultats obtenus avec ces différents modèles permettent d'obtenir des informations complémentaires (les pièces du puzzle) pour mieux appréhender le rôle physiologique de ce système neuroendocrinien.

Au vu des effets puissants de la ghréline sur la sécrétion de GH et la prise alimentaire, il serait attendu que le retrait des composants du système ghréline/GHS-R1a engendre des souris de taille réduite, plus minces et hypophagiques. Toutefois l'apparence et la prise alimentaire similaires des souris *Ghrl*^{-/-}, *Ghs-r*^{-/-} et *Goat*^{-/-} par rapport à leurs congénères sauvages suggère que la ghréline serait un peptide orexigène à ajouter à la liste des « peptides-orexigènes-dont-l'invalidation-n'a-pas-d'effet ». Loin d'être si catégorique, la subtilité du phénotype de ces différents modèles murins qui peut être léger mais reproductible en situation d'équilibre nutritionnel et/ou énergétique (accès *ad libitum* à la nourriture) peut se révéler par un challenge métabolique.

Tableau 1. Comparaison des paramètres phénotypiques des différents modèles de souris invalidées pour les composants du système ghréline/GOAT/GHS-R1a. ⁽¹⁾Kirchner *et al.*, 2009 ; ⁽²⁾ Zhao *et al.*, 2010. nd : non-déterminé ; id : identique ; TCM : triglycérides à chaînes moyennes ; WT : Wild-Type (souris sauvages).

	Modèle animal	Invalidation de la Ghréline (<i>Ghrl</i> ^{-/-})	Invalidation du GHS-R1a (<i>Ghs-r</i> ^{-/-})	Invalidation de la GOAT (<i>Goat</i> ^{-/-})
Régime standard	Poids corporel	↔	↘	↔
	Taille	↔	↘	↔
	Prise alimentaire/24h	↔	↔	↔
	Sécrétion de GH	↘	nd	↘
	IGF-1 plasmatiques	↔	↘	nd
	Composition corporelle	↔	↘ masse grasse	↔
	Métabolisme glucidique	Meilleure tolérance au glucose ↔ (jeunes et adultes) ↗ (souris âgées)	Meilleure tolérance au glucose ↔ (jeunes et adultes) ↔ (souris âgées)	Meilleure tolérance au glucose ↔ (jeunes et adultes) nd (souris âgées)
	Dépense énergétique			
Restriction calorique Jeûne	Perte de poids/Masse grasse	Identique aux souris sauvages	Identique aux souris sauvages	Identique aux souris sauvages
	Glycémie	↘↘	↘	↘↘↘↘
	Réflexe hyperphagique (Jeûne)	Identique aux souris sauvages	Identique aux souris sauvages	Identique aux souris sauvages
Régime riche en graisses	Exposition après sevrage	RÉSISTANCE A L'OBÉSITÉ ↘ Poids/masse grasse vs WT ↔ Prise alimentaire ↗ Dépense énergétique	RÉSISTANCE A L'OBÉSITÉ ↘ Poids/masse grasse vs WT ↔ Prise alimentaire ↘ Quotient respiratoire	RÉSISTANCE A L'OBÉSITÉ ↘↘ Poids/masse grasse vs WT ↗ Prise alimentaire ↗ Dépense énergétique
	Exposition à l'âge adulte	NON-RÉSISTANCE ↗ Poids corporel <i>id</i> WT ↗ Masse grasse <i>id</i> WT ↔ Prise alimentaire vs WT Meilleure tolérance au glucose	NON-RÉSISTANCE ↗ Poids corporel <i>id</i> WT ↗ Masse grasse <i>id</i> WT ↔ Prise alimentaire vs WT Meilleure tolérance au glucose	RÉSISTANCE⁽¹⁾ ou NON⁽²⁾ ⁽¹⁾ : ↘ Poids corporel vs WT ↔ Composition corporelle (Régime TCM) Meilleure tolérance au glucose

– « *Vie sans ghréline* », croissance et composition corporelle

Sous régime standard, les souris *Ghrl*^{-/-}, *Ghs-r*^{-/-} et *Goat*^{-/-} se développent de manière similaire ou quasi-similaire aux souris sauvages. Les souris *Ghrl*^{-/-} et *Goat*^{-/-} présentent un poids et une composition corporels identiques à ceux des souris sauvages (Asakawa *et al.*, 2003 ; Kirchner *et al.*, 2009). Toutefois, les souris *Ghs-r*^{-/-} présentent une légère diminution du poids corporel et de la taille (distance naso-anale) (Zigman *et al.*, 2005 ; Longo *et al.*, 2008), associée à une réduction de masse grasse (Zigman *et al.*, 2005) et une diminution modeste des taux sériques d'IGF-1 (Sun *et al.*, 2004 ; Zigman *et al.*, 2005).

Chez les souris *Ghrl*^{-/-} (Sun *et al.*, 2003), *Ghs-r*^{-/-} (Sun *et al.*, 2008) et *Goat*^{-/-} (Yi *et al.*, 2012 ; Zhao *et al.*, 2010), la perte de poids corporel, la diminution de masse grasse et des taux de leptine et d'insuline induites par une restriction calorique sont similaires à celles des souris sauvages.

Les souris *Ghrl*^{-/-} et *Ghs-r*^{-/-} adultes ne sont pas plus résistantes à l'obésité induite par un régime riche en graisses que les souris sauvages (Sun *et al.*, 2004, 2008 ; Wortley *et al.*, 2004). Toutefois, cette

résistance est observée lorsque le régime est démarré peu de temps après le sevrage (Wortley *et al.*, 2005 ; Zigman *et al.*, 2005), suggérant un rôle de la ghréline au cours de la période de croissance chez l'animal. Les souris *Goat*^{-/-} soumises à un régime riche en graisses classique¹ montrent une susceptibilité similaire à celle des souris sauvages (Zhao *et al.*, 2010). Néanmoins dans les mêmes conditions, les souris *Goat*^{-/-} générées par Kirchner *et al.* (2009) prennent moins de poids que les souris sauvages, en dépit d'une composition corporelle similaire. Dans cette même étude, lorsque le régime est enrichi en triglycérides à chaîne moyenne, les souris *Goat*^{-/-} montrent une réduction significative du poids corporel associée à une diminution de masse grasse et une augmentation de la dépense énergétique.

Seules trois études se sont intéressées à l'impact de l'absence de ghréline ou de sa signalisation sur la sécrétion pulsatile de la GH chez la souris. Chez les souris *Ghrl*^{-/-} mâles, qui ne synthétisent ni ghréline acylée ni ghréline désacylée, une diminution

¹ Dans cette étude, le régime riche en graisses contient principalement des lipides à chaînes longues provenant d'huile de soja et de saindoux (Cat No. D12451 ; *Research Diets*). Le terme « classique » est utilisé ici pour démarquer ce régime du régime hyperlipidique riche en triglycérides à chaîne moyenne utilisé par Kirchner *et al.* (2009).

transitoire de l'amplitude des pics sécrétoires de GH a été mise en évidence, sans toutefois de modification de la croissance staturo-pondérale (Hassouna *et al.*, 2014), suggérant que la ghréline endogène agit comme un modulateur de l'amplitude de sécrétion de GH durant la période de croissance rapide chez la souris. L'étude menée chez les souris *Goat*^{-/-} a permis de préciser que cet effet sur l'amplitude de sécrétion chez le mâle était spécifique de la forme acylée de ghréline. Dans cette dernière étude, la ghréline apparaît également importante pour le maintien du patron de sécrétion de la GH (Xie *et al.*, 2015). Des travaux récents réalisés dans notre laboratoire chez les souris *Ghs-r*^{-/-} montrent également que la régulation de l'amplitude de sécrétion de la GH par la ghréline se fait *via* un mécanisme GHS-R dépendant qui est différent chez le mâle et la femelle (Labarthe *et al.*, données non publiées). L'impact physiologique de la réduction de la sécrétion de GH reste à déterminer.

– « *Vie sans ghréline* » et prise alimentaire

Prise alimentaire homéostatique

La déficience en ghréline, GHS-R1a ou GOAT n'altère pas les aspects homéostatiques de la prise alimentaire en condition standard (Uchida *et al.*, 2013). En effet, la prise alimentaire et le rythme circadien sur 24 heures sont similaires à ceux des souris sauvages dans ces trois modèles. Dans ces conditions, comme chez les souris sauvages, le pic préprandial de ghréline ainsi que l'activité locomotrice en anticipation du repas existent toujours chez les souris *Ghs-r*^{-/-} (Gooley *et al.*, 2006). Ceci suggère qu'une signalisation ghréline intacte n'est pas nécessaire au maintien du rythme circadien de prise alimentaire. Toutefois Blum *et al.* (2009) montrent que l'activité d'anticipation liée à la distribution du repas programmé est nettement atténuée chez les souris *Ghs-r*^{-/-}.

Chez les souris *Ghrl*^{-/-}, *Ghs-r*^{-/-} et *Goat*^{-/-} la réponse alimentaire à un jeûne aigu de 24 ou de 48 heures est similaire à celle des souris sauvages (Uchida *et al.*, 2013). Ainsi, la perte et la reprise de poids corporel ainsi que le réflexe hyperphagique sont identiques entre les génotypes. Toutefois, les souris *Ghrl*^{-/-} et *Ghs-r*^{-/-} n'augmentent pas leur prise alimentaire comme le font les souris sauvages en réponse à des jeûnes répétés (Abizaid *et al.*, 2006). En condition de restriction calorique, les souris *Ghs-r*^{-/-} présentent une réponse locomotrice réduite en anticipation du repas programmé, ainsi qu'une diminution de l'activation neuronale de la voie mésolimbique dopaminergique (Blum *et al.*, 2009; Verhagen *et al.*, 2011; Lamont *et al.*, 2012). Dans l'ensemble, ces études suggèrent que la perte de la signalisation ghrélinergique conduit à une perte du comportement d'anticipation de la nourriture.

Sous régime riche en graisses, les souris *Ghrl*^{-/-} et *Ghs-r*^{-/-} consomment la même quantité de nourriture que les souris sauvages (Al Massadi *et al.*, 2015). Les souris *Goat*^{-/-} ne présentent pas non plus de modifications de la prise alimentaire sous régime riche en graisses classique (Zhao *et al.*, 2010). Toutefois, leur consommation est significativement augmentée lorsque le régime est riche en triglycérides à chaîne moyenne (Kirchner *et al.*, 2009).

Prise alimentaire hédonique

Les études chez les souris *Ghs-r*^{-/-} ont largement contribué à démontrer la nécessité d'une signalisation ghrélinergique intacte pour la régulation de différents aspects de la prise alimentaire hédonique (Pour revue, Uchida *et al.*, 2013). De plus, il semble que l'activité de la GOAT soit un régulateur important de la motivation alimentaire (Davis *et al.*, 2012). En effet, après un jeûne de 24 heures, les souris *Goat*^{-/-} placées dans un système de conditionnement opérant ont une moindre motivation pour l'obtention de nourriture par rapport aux souris sauvages (Davis *et al.*, 2012). Ces souris montrent également une diminution de la réponse alimentaire hédonique dans un protocole « d'effet dessert », dans lequel une nourriture agréable au goût et riche en graisses est proposée en guise de dessert à des souris rassasiées (Davis *et al.*, 2012).

– « *Vie sans ghréline* » et régulation du métabolisme énergétique

Métabolisme glucidique

Sous un régime standard, une meilleure tolérance au glucose est observée chez les souris *Goat*^{-/-} (Zhao *et al.*, 2010), *Ghrl*^{-/-} (Dezaki *et al.*, 2006) et *Ghs-r*^{-/-} (Zigman *et al.*, 2005).

Les souris *Goat*^{-/-} soumises à une restriction calorique drastique maintiennent difficilement leur glycémie par rapport aux souris sauvages et, si cette restriction est prolongée, les souris décèdent d'hypoglycémie sévère (Zhao *et al.*, 2010). Or cette dernière est prévenue par un traitement par la ghréline ou la GH. Toutefois, une étude ultérieure n'a pas trouvé de différence entre souris *Goat*^{-/-} et sauvages (Yi *et al.*, 2012). Cependant, la restriction calorique provoque également une forte hypoglycémie chez les souris *Ghrl*^{-/-} (Li *et al.*, 2012). Une diminution de la glycémie significativement plus prononcée que chez les souris sauvages est observée chez les souris *Ghs-r*^{-/-} lors d'une restriction calorique (Sun *et al.*, 2008).

L'exposition des souris *Ghs-r*^{-/-}, *Ghrl*^{-/-} et *Goat*^{-/-} à un régime riche en graisse confère une meilleure tolérance au glucose chez ces souris par rapport aux souris sauvages (Wortley *et al.*, 2005; Longo *et al.*, 2008).

Dans l'ensemble, ces études démontrent que la ghréline diminue la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline.

Métabolisme associé à l'âge

Les études du groupe de Lin *et al.* montrent qu'au cours du vieillissement, les souris *Ghs-r*^{-/-} et *Ghrl*^{-/-} présentent un meilleur profil métabolique et maintiennent un phénotype plus mince que les souris sauvages, dû à une moindre accumulation de masse grasse (Lin *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2011). En outre, les souris âgées présentent une meilleure sensibilité à l'insuline, une augmentation de la dépense énergétique et un meilleur profil lipidique que les souris sauvages du même âge. Toutefois, ce phénotype est plus marqué chez les souris *Ghs-r*^{-/-} que chez les souris *Ghrl*^{-/-}.

– Absence de ghréline à l'âge adulte

Les auteurs des études décrites ci-dessus concluent souvent que l'absence de phénotype majeur dans ces modèles pourrait être due à des mécanismes de compensation survenant au cours du développement. Récemment, McFarlane *et al.* (2014) ont développé un modèle murin d'invalidation conditionnelle de la ghréline. Ces souris expriment le récepteur de la toxine diphtérique au niveau des cellules sécrétrices de ghréline, ce qui permet de s'affranchir d'un impact développemental de l'invalidation de la ghréline. Ainsi, l'ablation de la ghréline chez la souris adulte n'a pas d'effet sur la prise alimentaire ni le poids corporel et n'induit pas de résistance à un régime riche en graisses. En revanche, une restriction calorique sévère provoque une forte hypoglycémie chez ces souris, confortant l'idée que la ghréline serait une « hormone de survie » dans certaines conditions de challenge métabolique (Cummins *et al.*, 2005).

Conclusions

Au carrefour entre nutrition, métabolisme et croissance, la ghréline apparaît comme une hormone essentielle à la survie de l'organisme en favorisant les apports nutritionnels, les adaptations métaboliques et le stockage d'énergie en période de croissance ou en situation de dénutrition chronique. Au-delà de ses actions bien caractérisées sur la sécrétion d'hormone de croissance et la prise alimentaire, *via* un mécanisme d'action dépendant du GHS-R et de la présence d'un groupement « acyl » qui lui permet de se lier à son récepteur, le rôle de la ghréline est plus complexe que ce qui avait été initialement décrit. En effet le gène de la préproghréline, à partir duquel la ghréline acylée est synthétisée, code également pour d'autres peptides dérivés qui modulent les actions métaboliques et

neuroendocrines de la ghréline acylée. D'autre part, le GHS-R possède une activité constitutive propre et peut s'associer à d'autres types de récepteurs, il peut donc induire des effets biologiques indépendamment de la présence de son ligand endogène, la ghréline. Les outils pharmacologiques et les modèles de souris génétiquement modifiées permettent aujourd'hui d'obtenir des informations complémentaires pour mieux appréhender le rôle physiologique de chacun des composants du système « ghréline-GHS-R ».

Remerciements. Les auteurs tiennent à remercier tous les membres de l'équipe « Neuroendocrinologie de la croissance et de la sénescence » pour leur contribution au cours des années à certains des travaux présentés ici. Ce travail a été financé par une AMR JEUNES CHERCHEUSES JEUNES CHERCHEURS AMR-12-JSV1-0013-01.

Références

- Abizaid, A., Liu, Z.W., Andrews, Z.B., Shanabrough, M., Borok, E., Elsworth, J.D., Roth, R.H., Sleeman, M.W., Picciotto, M.R., Tschop, M.H., Gao, X.B., Horvath, T.L. (2006). Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest*, 116, 3229-3239.
- Al Massadi, O., Lopez, M., Ferno, J., Dieguez, C., Nogueiras, R. (2015). What is the real relevance of endogenous ghrelin? *Peptides*, 70, 1-6.
- Andrews, Z.B. (2011). The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function. *Trends Neurosci*, 34, 31-40.
- Angeloni, S.V., Glynn, N., Ambrosini, G., Garant, M.J., Higley, J.D., Suomi, S., Hansen, B.C. (2004). Characterization of the rhesus monkey ghrelin gene and factors influencing ghrelin gene expression and fasting plasma levels. *Endocrinology*, 145, 2197-2205.
- Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Katsuura, G., Fujimiya, M., Fujino, M.A., Kasuga, M. (2003). Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut*, 52, 947-952.
- Asakawa, A., Inui, A., Fujimiya, M., Sakamaki, R., Shinfuku, N., Ueta, Y., Meguid, M.M., Kasuga, M. (2005). Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*, 54, 18-24.
- Bagnasco, M., Kalra, P.S., Kalra, S.P. (2002). Ghrelin and leptin pulse discharge in fed and fasted rats. *Endocrinology*, 143, 726-729.
- Baragli, A., Lanfranco, F., Allasia, S., Granata, R., Ghigo, E. (2011). Neuroendocrine and metabolic activities of ghrelin gene products. *Peptides*, 32, 2323-2332.
- Barazzoni, R., Zanetti, M., Ferreira, C., Vinci, P., Pirulli, A., Mucci, M., Dore, F., Fonda, M., Ciochi, B., Cattin, L., Guarnieri, G. (2007). Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 3935-3940.

- Barnett, B.P., Hwang, Y., Taylor, M.S., Kirchner, H., Pfluger, P.T., Bernard, V., Lin, Y.Y., Bowers, E.M., Mukherjee, C., Song, W.J., Longo, P.A., Leahy, D.J., Hussain, M.A., Tschop, M.H., Boeke, J.D., Cole, P.A. (2010). Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. *Science*, 330, 1689-1692.
- Benso, A., St-Pierre, D.H., Prodam, F., Gramaglia, E., Granata, R., van der Lely, A.J., Ghigo, E., Broglio, F. (2012). Metabolic effects of overnight continuous infusion of unacylated ghrelin in humans. *Eur J Endocrinol*, 166, 911-916.
- Blum, I.D., Patterson, Z., Khazall, R., Lamont, E.W., Sleeman, M.W., Horvath, T.L., Abizaid, A. (2009). Reduced anticipatory locomotor responses to scheduled meals in ghrelin receptor deficient mice. *Neuroscience*, 164, 351-359.
- Bowers, C., Chang, J., Momany, F., Folkers, K. (1977). *Effects of enkephalins and enkephalins analogs on release of pituitary hormones in vitro*. Elsevier, Amsterdam/North Holland.
- Bowers, C.Y., Momany, F., Reynolds, G.A., Chang, D., Hong, A., Chang, K. (1980). Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology*, 106, 663-667.
- Bowers, C.Y., Momany, F.A., Reynolds, G.A., Hong, A. (1984). On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology*, 114, 1537-1545.
- Bowers, C.Y., Sartor, A.O., Reynolds, G.A., Badger, T.M. (1991). On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP. *Endocrinology*, 128, 2027-2035.
- Briggs, D.I., Andrews, Z.B. (2011). Metabolic status regulates ghrelin function on energy homeostasis. *Neuroendocrinology*, 93, 48-57.
- Briggs, D.I., Enriori, P.J., Lemus, M.B., Cowley, M.A., Andrews, Z.B. (2010). Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. *Endocrinology*, 151, 4745-4755.
- Briggs, D.I., Lockie, S.H., Wu, Q., Lemus, M.B., Stark, R., Andrews, Z.B. (2013). Calorie-restricted weight loss reverses high-fat diet-induced ghrelin resistance, which contributes to rebound weight gain in a ghrelin-dependent manner. *Endocrinology*, 154, 709-717.
- Broglio, F., Arvat, E., Benso, A., Gottero, C., Muccioli, G., Papotti, M., van der Lely, A.J., Deghenghi, R., Ghigo, E. (2001). Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 5083-5086.
- Broglio, F., Gottero, C., Prodam, F., Gauna, C., Muccioli, G., Papotti, M., Abribat, T., Van der Lely, A.J., Ghigo, E. (2004). Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 3062-3065.
- Callaghan, B., Furness, J.B. (2014). Novel and conventional receptors for ghrelin, desacyl-ghrelin, and pharmacologically related compounds. *Pharmacol Rev*, 66, 984-1001.
- Callahan, H.S., Cummings, D.E., Pepe, M.S., Breen, P.A., Matthys, C.C., Weigle, D.S. (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, 1319-1324.
- Camina, J.P., Carreira, M.C., El Messari, S., Llorens-Cortes, C., Smith, R.G., Casanueva, F.F. (2004). Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. *Endocrinology*, 145, 930-940.
- Cederberg, H., Koivisto, V.M., Jokelainen, J., Surcel, H.M., Keinänen-Kiukaanniemi, S., Rajala, U. (2012). Unacylated ghrelin is associated with changes in insulin sensitivity and lipid profile during an exercise intervention. *Clin Endocrinol*, 76, 39-45.
- Chartrel, N., Alvear-Perez, R., Leprince, J., Iturrioz, X., Réaux-Le Goazigo, A., Audinot, V., Chomarot, P., Coge, F., Nosjean, O., Rodriguez, M., Galizzi, J.P., Boutin, J.A., Vaudry, H., Llorens-Cortes, C. (2012). Comment on "Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake". *Science*, 315, 766 ; author reply 766.
- Chebani, Y., Marion, C., Zizzari, P., Chettab, K., Pastor, M., Korostelev, M., Geny, D., Epelbaum, J., Tolle, V., Morisset-Lopez, S., Pantel, J. (2016). Enhanced responsiveness of Ghnr Q343X rats to ghrelin results in enhanced adiposity without increased appetite. *Sci Signal*, 9, ra39.
- Clark, R.G., Carlsson, L.M., Trojnar, J., Robinson, I.C. (1989). The effects of a growth hormone-releasing peptide and growth hormone-releasing factor in conscious and anaesthetized rats. *J Neuroendocrinol*, 1, 249-255.
- Cummings, D.E. (2006). Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav*, 89, 71-84.
- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., Weigle, D.S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, 50, 1714-1719.
- Cummings, D.E., Frayo, R.S., Marmonier, C., Aubert, R., Chapelot, D. (2004). Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287, E297-304.
- Cummings, D.E., Foster-Schubert, K.E., Overduin, J. (2005). Ghrelin and energy balance : focus on current controversies. *Curr Drug Targets*, 6, 153-169.
- Date, Y., Murakami, N., Kojima, M., Kuroiwa, T., Matsukura, S., Kangawa, K., Nakazato, M. (2000). Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 275, 477-480.
- Davis, J.F., Perello, M., Choi, D.L., Magrisso, I.J., Kirchner, H., Pfluger, P.T., Tschoep, M., Zigman, J.M., Benoit, S.C. (2012). GOAT induced ghrelin acylation regulates hedonic feeding. *Horm Behav*, 62, 598-604.

- Delhanty, P.J., Sun, Y., Visser, J.A., van Kerkwijk, A., Huisman, M., van Ijcken, W.F., Swagemakers, S., Smith, R.G., Themmen, A.P., van der Lely, A.J. (2010). Unacylated ghrelin rapidly modulates lipogenic and insulin signaling pathway gene expression in metabolically active tissues of GHSR deleted mice. *PLoS One*, 5, e11749.
- Delhanty, P.J., van der Lely, A.J. (2011). Ghrelin and glucose homeostasis. *Peptides*, 32, 2309-2318.
- Delhanty, P.J., Neggers, S.J., van der Lely, A.J. (2012). Mechanisms in endocrinology : Ghrelin : the differences between acyl- and des-acyl ghrelin. *Eur J Endocrinol*, 167, 601-608.
- Delhanty, P.J., Neggers, S.J., van der Lely, A.J. (2013). Des-acyl ghrelin : a metabolically active peptide. *Endocr Dev*, 25, 112-121.
- Delhanty, P.J., van der Velde, M., van der Eerden, B.C., Sun, Y., Geminn, J.M., van der Lely, A.J., Smith, R.G., van Leeuwen, J.P. (2014). Genetic manipulation of the ghrelin signaling system in male mice reveals bone compartment specificity of acylated and unacylated ghrelin in the regulation of bone remodeling. *Endocrinology*, 155, 4287-4295.
- Dezaki, K., Sone, H., Koizumi, M., Nakata, M., Kakei, M., Nagai, H., Hosoda, H., Kangawa, K., Yada, T. (2006). Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes*, 55, 3486-3493.
- Dezaki, K., Kakei, M., Yada, T. (2007). Ghrelin uses G α (i2) and activates voltage-dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin release in islet beta-cells : novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes*, 56, 2319-2327.
- Drazen, D.L., Vahl, T.P., D'Alessio, D.A., Seeley, R.J., Woods, S.C. (2006). Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion : evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology*, 147, 23-30.
- Edwards, A., Abizaid, A. (2016). Driving the need to feed : Insight into the collaborative interaction between ghrelin and endocannabinoid systems in modulating brain reward systems. *Neurosci Biobehav Rev*, 66, 33-53.
- Egecioglu, E., Jerlhag, E., Salome, N., Skibicka, K.P., Haage, D., Bohlooly, Y.M., Andersson, D., Bjursell, M., Perrissoud, D., Engel, J.A., Dickson, S.L. (2010). Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents. *Addict Biol*, 15, 304-311.
- Feng, D.D., Yang, S.K., Loudes, C., Simon, A., Al-Sarraf, T., Culler, M., Alvear-Perez, R., Llorens-Cortes, C., Chen, C., Epelbaum, J., Gardette, R. (2011). Ghrelin and obestatin modulate growth hormone-releasing hormone release and synaptic inputs onto growth hormone-releasing hormone neurons. *Eur J Neurosci*, 34, 732-744.
- Fernandez, G., Cabral, A., Cornejo, M.P., De Francesco, P.N., Garcia-Romero, G., Reynaldo, M., Perello, M. (2016). Des-Acyl Ghrelin Directly Targets the Arcuate Nucleus in a Ghrelin-Receptor Independent Manner and Impairs the Orexigenic Effect of Ghrelin. *J Neuroendocrinol*, 28, 12349.
- Filigheddu, N., Gnocchi, V.F., Coscia, M., Cappelli, M., Porporato, P.E., Taulli, R., Traini, S., Baldanzi, G., Chianale, F., Cutrupi, S., Arnoletti, E., Ghe, C., Fubini, A., Surico, N., Sinigaglia, F., Ponzetto, C., Muccioli, G., Crepaldi, T., Graziani, A. (2007). Ghrelin and des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of C2C12 skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell*, 18, 986-994.
- Fukushima, N., Hanada, R., Teranishi, H., Fukue, Y., Tachibana, T., Ishikawa, H., Takeda, S., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kangawa, K., Nagata, K., Kojima, M. (2005). Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res*, 20, 790-798.
- Gauna, C., Meyler, F.M., Janssen, J.A., Delhanty, P.J., Aribat, T., van Koetsveld, P., Hofland, L.J., Broglio, F., Ghigo, E., van der Lely, A.J. (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.
- Germain, N., Galusca, B., Grouselle, D., Frère, D., Tolle, V., Zizzari, P., Lang, F., Epelbaum, J., Estour, B. (2009). Ghrelin/obestatin ratio in two populations with low bodyweight : constitutional thinness and anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 413-419.
- Germain, N., Galusca, B., Grouselle, D., Frère, D., Billard, S., Epelbaum, J., Estour, B. (2010). Ghrelin and obestatin circadian levels differentiate bingeing-purging from restrictive anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*, 95, 3057-3062.
- Gooley, J.J., Schomer, A., Saper, C.B. (2006). The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci*, 9, 398-407.
- Gorwood, P., Blanchet-Collet, C., Chartrel, N., Duclos, J., Dechelotte, P., Hanachi, M., Fetissof, S., Godart, N., Melchior, J.C., Ramoz, N., Rovere-Jovene, C., Tolle, V., Viltart, O., Epelbaum, J. (2016). New Insights in Anorexia Nervosa. *Front Neurosci*, 10, 256.
- Granata, R., Settanni, F., Biancone, L., Trovato, L., Nano, R., Bertuzzi, F., Destefanis, S., Annunziata, M., Martinetti, M., Catapano, F., Ghe, C., Isgaard, J., Papotti, M., Ghigo, E., Muccioli, G. (2007). Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets : involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidyl inositol 3-Kinase/Akt signaling. *Endocrinology*, 148, 512-529.
- Gutierrez, J.A., Solenberg, P.J., Perkins, D.R., Willency, J.A., Knierman, M.D., Jin, Z., Witcher, D.R., Luo, S., Onyia, J.E., Hale, J.E. (2008). Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 6320-6325.
- Halem, H.A., Taylor, J.E., Dong, J.Z., Shen, Y., Datta, R., Abizaid, A., Diano, S., Horvath, T.L., Culler, M.D. (2005). A novel growth hormone secretagogue-1a receptor antagonist that blocks ghrelin-induced growth hormone secretion but induces increased body weight gain. *Neuroendocrinology*, 81, 339-349.

- Hansen, T.K., Dall, R., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Christiansen, J.S., Jorgensen, J.O. (2002). Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol*, 56, 203-206.
- Hassouna, R., Zizzari, P., Viltart, O., Yang, S.K., Gardette, R., Videau, C., Badoer, E., Epelbaum, J., Tolle, V. (2012). A natural variant of obestatin, Q90L, inhibits ghrelin's action on food intake and GH secretion and targets NPY and GHRH neurons in mice. *PLoS One*, 7, e51135.
- Hassouna, R., Labarthe, A., Zizzari, P., Videau, C., Culler, M., Epelbaum, J., Tolle, V. (2013). Actions of Agonists and Antagonists of the ghrelin/GHS-R Pathway on GH Secretion, Appetite, and cFos Activity. *Front Endocrinol*, 4, 25.
- Hassouna, R., Zizzari, P., Tomasetto, C., Veldhuis, J.D., Fiquet, O., Labarthe, A., Cognet, J., Steyn, F., Chen, C., Epelbaum, J., Tolle, V. (2014). An early reduction in GH peak amplitude in preproghrelin-deficient male mice has a minor impact on linear growth. *Endocrinology*, 155, 3561-3571.
- Hassouna, R., Labarthe, A., Tolle, V. (2016). Hypothalamic regulation of body growth and appetite by ghrelin-derived peptides during balanced nutrition or undernutrition. *Mol Cell Endocrinol*, 438, 42-51.
- Holst, B., Schwartz, T.W. (2006). Ghrelin receptor mutations—too little height and too much hunger. *J Clin Invest*, 116, 637-641.
- Holst, B., Cygankiewicz, A., Jensen, T.H., Ankersen, M., and Schwartz, T.W. (2003). High constitutive signaling of the ghrelin receptor—identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol*, 17, 2201-2210.
- Holst, B., Egerod, K.L., Schild, E., Vickers, S.P., Cheetham, S., Gerlach, L.O., Storjohann, L., Stidsen, C.E., Jones, R., Beck-Sickinger, A.G., Schwartz, T.W. (2007). GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology*, 148, 13-20.
- Hosoda, H., Kojima, M., Mizushima, T., Shimizu, S., Kangawa, K. (2003). Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem*, 278, 64-70.
- Hosoda, H., Doi, K., Nagaya, N., Okumura, H., Nakagawa, E., Enomoto, M., Ono, F., Kangawa, K. (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, 1077-1080.
- Howard, A.D., Feighner, S.D., Cully, D.F., Arena, J.P., Liberators, P.A., Rosenblum, C.I., Hamelin, M., Hreniuk, D.L., Palyha, O.C., Anderson, J., Paress, P.S., Diaz, C., Chou, M., Liu, K.K., McKee, K.K., Pong, S.S., Chaung, L.Y., Elbrecht, A., Dashkevich, M., Heavens, R., Rigby, M., Sirinathsinghji, D.J., Dean, D.C., Melillo, D.G., Patchett, A.A., Nargund, R., Griffin, P.R., DeMartino, J.A., Gupta, S.K., Schaeffer, J.M., Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 273, 974-977.
- Inhoff, T., Monnikes, H., Noetzel, S., Stengel, A., Goebel, M., Dinh, Q.T., Riedl, A., Bannert, N., Wisser, A.S., Wiedenmann, B., Klapp, B.F., Tache, Y., Kobelt, P. (2008). Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides*, 29, 2159-2168.
- Iwakura, H., Akamizu, T., Ariyasu, H., Irako, T., Hosoda, K., Nakao, K., Kangawa, K. (2007). Effects of ghrelin administration on decreased growth hormone status in obese animals. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293, E819-825.
- Iwakura, H., Kangawa, K., Nakao, K. (2015). The regulation of circulating ghrelin - with recent updates from cell-based assays. *Endocr J*, 62, 107-122.
- Jiang, H., Betancourt, L., Smith, R.G. (2006). Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Mol Endocrinol*, 20, 1772-1785.
- Kern, A., Albarran-Zeckler, R., Walsh, H.E., Smith, R.G. (2012). Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron*, 73, 317-332.
- Kern, A., Mavrikaki, M., Ullrich, C., Albarran-Zeckler, R., Brantley, A.F., Smith, R.G. (2015). Hippocampal Dopamine/DRD1 Signaling Dependent on the Ghrelin Receptor. *Cell*, 163, 1176-1190.
- Kim, M.S., Yoon, C.Y., Park, K.H., Shin, C.S., Park, K.S., Kim, S.Y., Cho, B.Y., Lee, H.K. (2003). Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *Neuroreport*, 14, 1317-1320.
- Kirchner, H., Gutierrez, J.A., Solenberg, P.J., Pfluger, P.T., Czyzyk, T.A., Willency, J.A., Schürmann, A., Joost, H.-G., Jandacek, R.J., Hale, J.E., Heiman, M.L., Tschöp, M.H. (2009). GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med*, 15, 741-745.
- Kohno, D., Gao, H.Z., Muroya, S., Kikuyama, S., Yada, T. (2003). Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus : Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes*, 52, 948-956.
- 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., Goldstone, A.P., Gueorguiev, M., Grossman, A.B. (2004). Ghrelin—a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol*, 25, 27-68.
- Lamont, E.W., Patterson, Z., Rodrigues, T., Vallejos, O., Blum, I.D., Abizaid, A. (2012). Ghrelin-deficient mice have fewer orexin cells and reduced cFOS expression in the mesolimbic dopamine pathway under a restricted feeding paradigm. *Neuroscience*, 218, 12-19.

- 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.
- Li, R.L., Sherbet, D.P., Elsbernd, B.L., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Zhao, T.J. (2012). Profound hypoglycemia in starved, ghrelin-deficient mice is caused by decreased gluconeogenesis and reversed by lactate or fatty acids. *J Biol Chem*, 287, 17942-17950.
- Lim, C.T., Kola, B., Grossman, A., Korbonits, M. (2011). The expression of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in human tissues. *Endocr J*, 58, 707-710.
- Lin, L., Saha, P.K., Ma, X., Henshaw, I.O., Shao, L., Chang, B.H., Buras, E.D., Tong, Q., Chan, L., McGuinness, O.P., Sun, Y. (2011). Ablation of ghrelin receptor reduces adiposity and improves insulin sensitivity during aging by regulating fat metabolism in white and brown adipose tissues. *Aging Cell*, 10, 996-1010.
- Lindeman, J.H., Pijl, H., Van Dielen, F.M., Lentjes, E.G., Van Leuven, C., Kooistra, T. (2002). Ghrelin and the hyposomatotropism of obesity. *Obes Res* 10, 1161-1166.
- Longo, K.A., Charoenthongtrakul, S., Giuliana, D.J., Govek, E.K., McDonagh, T., Qi, Y., DiStefano, P.S., Geddes, B.J. (2008). Improved insulin sensitivity and metabolic flexibility in ghrelin receptor knockout mice. *Regul Pept*, 150, 55-61.
- Luque, R.M., Kineman, R.D. (2006). Impact of obesity on the growth hormone axis : evidence for a direct inhibitory effect of hyperinsulinemia on pituitary function. *Endocrinology*, 147, 2754-2763.
- Ma, C., Fukuda, T., Ochi, H., Sunamura, S., Xu, C., Xu, R., Okawa, A., Takeda, S. (2015). Genetic determination of the cellular basis of the ghrelin-dependent bone remodeling. *Mol Metab*, 4, 175-185.
- Ma, X., Lin, L., Qin, G., Lu, X., Fiorotto, M., Dixit, V.D., Sun, Y. (2011). Ablations of ghrelin and ghrelin receptor exhibit differential metabolic phenotypes and thermogenic capacity during aging. *PLoS One*, 6, e16391.
- Maccarinelli, G., Sibilia, V., Torsello, A., Raimondo, F., Pitto, M., Giustina, A., Netti, C., Cocchi, D. (2005). Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *J Endocrinol*, 184, 249-256.
- Malozowski, S., Hao, E.H., Ren, S.G., Marin, G., Liu, L., Southers, J.L., Merriam, G.R. (1991). Growth hormone (GH) responses to the hexapeptide GH-releasing peptide and GH-releasing hormone (GHRH) in the cynomolgus macaque : evidence for non-GHRH-mediated responses. *J Clin Endocrinol Metab*, 73, 314-317.
- McFarlane, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Zhao, T.J. (2014). Induced ablation of ghrelin cells in adult mice does not decrease food intake, body weight, or response to high-fat diet. *Cell Metabolism*, 20, 54-60.
- Moechars, D., Depoortere, I., Moreaux, B., de Smet, B., Goris, I., Hoskens, L., Daneels, G., Kass, S., Ver Donck, L., Peeters, T., Coulie, B. (2006). Altered gastrointestinal and metabolic function in the GPR39-obestatin receptor-knockout mouse. *Gastroenterology*, 131, 1131-1141.
- Mondal, M.S., Toshinai, K., Ueno, H., Koshinaka, K., Nakazato, M. (2008). Characterization of obestatin in rat and human stomach and plasma, and its lack of acute effect on feeding behavior in rodents. *J Endocrinol*, 198, 339-346.
- Muller, A.F., Lamberts, S.W., Janssen, J.A., Hoffland, L.J., Koetsveld, P.V., Bidlingmaier, M., Strasburger, C.J., Ghigo, E., van der Lely, A.J. (2002). Ghrelin drives GH secretion during fasting in man. *Eur J Endocrinol*, 146, 203-207.
- 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.
- Nass, R., Farhy, L.S., Liu, J., Prudom, C.E., Johnson, M.L., Veldhuis, P., Pezzoli, S.S., Oliveri, M.C., Gaylinn, B.D., Geysen, H.M., Thorner, M.O. (2008). Evidence for acyl-ghrelin modulation of growth hormone release in the fed state. *J Clin Endocrinol Metab*, 93, 1988-1994.
- Nogueiras, R., Pfluger, P., Tovar, S., Arnold, M., Mitchell, S., Morris, A., Perez-Tilve, D., Vazquez, M.J., Wiedmer, P., Castaneda, T.R., DiMarchi, R., Tschop, M., Schurmann, A., Joost, H.G., Williams, L.M., Langhans, W., Dieguez, C. (2007). Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology*, 148, 21-26.
- Nogueiras, R., Tovar, S., Mitchell, S.E., Rayner, D.V., Archer, Z.A., Dieguez, C., Williams, L.M. (2004). Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the arcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin. *Diabetes*, 53, 2552-2558.
- Osterstock, G., Escobar, P., Mitutsova, V., Gouty-Colomer, L.A., Fontanaud, P., Molino, F., Fehrentz, J.A., Carmignac, D., Martinez, J., Guerieu, N.C., Robinson, I.C., Mollard, P., Mery, P.F. (2010). Ghrelin stimulation of growth hormone-releasing hormone neurons is direct in the arcuate nucleus. *PLoS One*, 5, e9159.
- Ozcan, B., Neggers, S.J., Miller, A.R., Yang, H.C., Lucaites, V., Abribat, T., Allas, S., Huisman, M., Visser, J.A., Themmen, A.P., Sijbrands, E.J., Delhanty, P.J., van der Lely, A.J. (2014). Does des-acyl ghrelin improve glycemic control in obese diabetic subjects by decreasing acylated ghrelin levels? *Eur J Endocrinol*, 170, 799-807.
- Pantel, J., Legendre, M., Cabrol, S., Hilal, L., Hajaji, Y., Morisset, S., Nivot, S., Vie-Luton, M.-P., Grouselle, D., de Kerdanet, M., Kadiri, A., Epelbaum, J., Le Bouc, Y., Amselem, S. (2006). Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest*, 116, 760-768.
- Park, S., Jiang, H., Zhang, H., Smith, R.G. (2012). Modification of ghrelin receptor signaling by somatostatin receptor-5 regulates insulin release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 19003-19008.
- Patterson, M., Murphy, K.G., le Roux, C.W., Ghatei, M.A., Bloom, S.R. (2005). Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 2205-2211.

- Perello, M., Sakata, I., Birnbaum, S., Chuang, J.C., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S.A., Woloszyn, J., Yanagisawa, M., Lutter, M., Zigman, J.M. (2010). Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol Psychiatry*, 67, 880-886.
- Petersen, P.S., Woldbye, D.P., Madsen, A.N., Egerod, K.L., Jin, C., Lang, M., Rasmussen, M., Beck-Sickinger, A.G., Holst, B. (2009). In vivo characterization of high basal signaling from the ghrelin receptor. *Endocrinology*, 150, 4920-4930.
- Porporato, P.E., Filigheddu, N., Reano, S., Ferrara, M., Angelino, E., Gnocchi, V.F., Prodam, F., Ronchi, G., Fagoonee, S., Fornaro, M., Chianale, F., Baldanzi, G., Surico, N., Sinigaglia, F., Perroteau, I., Smith, R.G., Sun, Y., Geuna, S., Graziani, A. (2013). Acylated and unacylated ghrelin impair skeletal muscle atrophy in mice. *J Clin Invest*, 123, 611-622.
- Reano, S., Graziani, A., Filigheddu, N. (2014). Acylated and unacylated ghrelin administration to blunt muscle wasting. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 17, 236-240.
- Rediger, A., Piechowski, C.L., Yi, C.X., Tarnow, P., Strotmann, R., Gruters, A., Krude, H., Schoneberg, T., Tschop, M.H., Kleinau, G., Biebermann, H. (2011). Mutually opposite signal modulation by hypothalamic heterodimerization of ghrelin and melanocortin-3 receptors. *J Biol Chem*, 286, 39623-39631.
- Rediger, A., Tarnow, P., Bickenbach, A., Schaefer, M., Krude, H., Gruters, A., Biebermann, H. (2009). Heterodimerization of hypothalamic G-protein-coupled receptors involved in weight regulation. *Obes Facts*, 2, 80-86.
- Reichenbach, A., Steyn, F.J., Sleeman, M.W., Andrews, Z.B. (2012). Ghrelin receptor expression and colocalization with anterior pituitary hormones using a GHSR-GFP mouse line. *Endocrinology* 153, 5452-5466.
- Resh, M.D. (2016). Fatty acylation of proteins : The long and the short of it. *Prog Lipid Res*, 63, 120-131.
- Rettori, V., Milenkovic, L., Aguila, M.C., McCann, S.M. (1990). Physiologically significant effect of neuropeptide Y to suppress growth hormone release by stimulating somatostatin discharge. *Endocrinology*, 126, 2296-2301.
- Sakata, I., Yang, J., Lee, C.E., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S.A., Elmquist, J.K., Zigman, J.M. (2009). Colocalization of ghrelin O-acyltransferase and ghrelin in gastric mucosal cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297, E134-141.
- Salome, N., Haage, D., Perrissoud, D., Moulin, A., Demange, L., Egecioglu, E., Fehrentz, J.A., Martinez, J., Dickson, S.L. (2009). Anorexigenic and electrophysiological actions of novel ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonists in rats. *Eur J Pharmacol*, 612, 167-173.
- Schellekens, H., Dinan, T.G., Cryan, J.F. (2013a). Taking two to tango : a role for ghrelin receptor heterodimerization in stress and reward. *Front Neurosci*, 7, 148.
- Schellekens, H., van Oeffelen, W.E., Dinan, T.G., Cryan, J.F. (2013b). Promiscuous dimerization of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) attenuates ghrelin-mediated signaling. *J Biol Chem*, 288, 181-191.
- Schellekens, H., De Francesco, P.N., Kandil, D., Theeuwes, W.F., McCarthy, T., van Oeffelen, W.E., Perello, M., Giblin, L., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2015). Ghrelin's Orexigenic Effect Is Modulated via a Serotonin 2C Receptor Interaction. *ACS Chem Neurosci*, 6, 1186-1197.
- Seim, I., Collet, C., Herington, A.C., Chopin, L.K. (2007). Revised genomic structure of the human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and natural antisense transcripts. *BMC Genomics*, 8, 298.
- Seim, I., Walpole, C., Amorim, L., Josh, P., Herington, A., Chopin, L. (2011). The expanding roles of the ghrelin-gene derived peptide obestatin in health and disease. *Mol Cell Endocrinol*, 340, 111-117.
- Seoane, L.M., Tovar, S., Baldelli, R., Arvat, E., Ghigo, E., Casanueva, F.F., Dieguez, C. (2000). Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats. *Eur J Endocrinol*, 143, R7-9.
- Sheriff, S., Kadeer, N., Joshi, R., Friend, L.A., James, J.H., Balasubramaniam, A. (2012). Des-acyl ghrelin exhibits pro-anabolic and anti-catabolic effects on C2C12 myotubes exposed to cytokines and reduces burn-induced muscle proteolysis in rats. *Mol Cell Endocrinol*, 351, 286-295.
- Shimbara, T., Mondal, M.S., Kawagoe, T., Toshinai, K., Koda, S., Yamaguchi, H., Date, Y., Nakazato, M. (2004). Central administration of ghrelin preferentially enhances fat ingestion. *Neurosci Lett*, 369, 75-79.
- Sivertsen, B., Holliday, N., Madsen, A.N., Holst, B. (2013). Functionally biased signalling properties of 7TM receptors - opportunities for drug development for the ghrelin receptor. *Br J Pharmacol*, 170, 1349-1362.
- Soriano-Guillen, L., Barrios, V., Campos-Barros, A., Argente, J. (2004). Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa : effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr*, 144, 36-42.
- Stevanovic, D.M., Grefhorst, A., Themmen, A.P., Popovic, V., Holstege, J., Haasdijk, E., Trajkovic, V., van der Lely, A.J., Delhanty, P.J. (2014). Unacylated ghrelin suppresses ghrelin-induced neuronal activity in the hypothalamus and brainstem of male rats [corrected]. *PLoS One*, 9, e98180.
- Sun, Y., Ahmed, S., Smith, R.G. (2003). Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol*, 23, 7973-7981.
- Sun, Y., Wang, P., Zheng, H., Smith, R.G. (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.
- Sun, Y., Asnicar, M., Saha, P.K., Chan, L., Smith, R.G. (2006). Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab*, 3, 379-386.
- Sun, Y., Butte, N.F., Garcia, J.M., Smith, R.G. (2008). Characterization of adult ghrelin and ghrelin receptor knockout mice under positive and negative energy balance. *Endocrinology*, 149, 843-850.

- Tang, S.Q., Jiang, Q.Y., Zhang, Y.L., Zhu, X.T., Shu, G., Gao, P., Feng, D.Y., Wang, X.Q., Dong, X.Y. (2008). Obestatin : its physicochemical characteristics and physiological functions. *Peptides*, 29, 639-645.
- Tannenbaum, G.S., Lapointe, M., Beaudet, A., Howard, A.D. (1998). Expression of growth hormone secretagogue-receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology*, 139, 4420-4423.
- 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, 967-974.
- Tassone, F., Broglio, F., Destefanis, S., Rovere, S., Benso, A., Gottero, C., Prodham, F., Rossetto, R., Gauna, C., van der Lely, A.J., Ghigo, E., Maccario, M. (2003). Neuroendocrine and metabolic effects of acute ghrelin administration in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 5478-5483.
- Tolle, V., Zizzari, P., Tomasetto, C., Rio, M.C., Epelbaum, J., Bluet-Pajot, M.T. (2001). In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*, 73, 54-61.
- Tolle, V., Bassant, M.H., Zizzari, P., Poindessous-Jazat, F., Tomasetto, C., Epelbaum, J., Bluet-Pajot, M.T. (2002). Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology*, 143, 1353-1361.
- Tolle, V., Kadem, M., Bluet-Pajot, M.T., Frère, 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.
- Tomasetto, C., Wendling, C., Rio, M.C., Poitras, P. (2001). Identification of cDNA encoding motilin related peptide/ghrelin precursor from dog fundus. *Peptides*, 22, 2055-2059.
- Tong, J., Mannea, E., Aime, P., Pfluger, P.T., Yi, C.X., Castaneda, T.R., Davis, H.W., Ren, X., Pixley, S., Benoit, S., Julliard, K., Woods, S.C., Horvath, T.L., Sleeman, M.M., D'Alessio, D., Obici, S., Frank, R., Tschop, M.H. (2011). Ghrelin enhances olfactory sensitivity and exploratory sniffing in rodents and humans. *J Neurosci*, 31, 5841-5846.
- Torsello, A., Scibona, B., Leo, G., Bresciani, E., Avallone, R., Bulgarelli, I., Luoni, M., Zoli, M., Rindi, G., Cocchi, D., Locatelli, V. (2003). Ontogeny and tissue-specific regulation of ghrelin mRNA expression suggest that ghrelin is primarily involved in the control of extraendocrine functions in the rat. *Neuroendocrinology*, 77, 91-99.
- Toshinai, K., Mondal, M.S., 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.
- Tremblay, F., Perreault, M., Klaman, L.D., Tobin, J.F., Smith, E., Gimeno, R.E. (2007). Normal food intake and body weight in mice lacking the G protein-coupled receptor GPR39. *Endocrinology*, 148, 501-506.
- Tschop, M., Smiley, D.L., Heiman, M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407, 908-913.
- Tschop, M., Wawarta, R., Riepl, R.L., Friedrich, S., Bidlingmaier, M., Landgraf, R., Folwaczny, C. (2001a). Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*, 24, RC19-21.
- Tschop, M., Weyer, C., Tataranni, P.A., Devanarayan, V., Ravussin, E., Heiman, M.L. (2001b). Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, 50, 707-709.
- Uchida, A., Zigman, J.M., Perello, M. (2013). Ghrelin and eating behavior : evidence and insights from genetically-modified mouse models. *Front Neurosci*, 7, 121.
- van der Lely, A.J., Tschop, M., Heiman, M.L., Ghigo, E. (2004). Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev*, 25, 426-457.
- van der Velde, M., Delhanty, P., van der Eerden, B., van der Lely, A.J., van Leeuwen, J. (2008). Ghrelin and bone. *Vitam Horm*, 77, 239-258.
- Verbaeys, I., Tolle, V., Swennen, Q., Zizzari, P., Buyse, J., Epelbaum, J., Cokelaere, M. (2011). Scheduled feeding results in adipogenesis and increased acylated ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 300, E1103-1111.
- Verhagen, L.A., Egecioglu, E., Luijendijk, M.C., Hillebrand, J.J., Adan, R.A., Dickson, S.L. (2011). Acute and chronic suppression of the central ghrelin signaling system reveals a role in food anticipatory activity. *Eur Neuropsychopharmacol*, 21, 384-392.
- Wang, D.H., Hu, Y.S., Du, J.J., Hu, Y.Y., Zhong, W.D., Qin, W.J. (2009). Ghrelin stimulates proliferation of human osteoblastic TE85 cells via NO/cGMP signaling pathway. *Endocrine*, 35, 112-117.
- Wang, H.J., Geller, F., Dempfle, A., Schauble, N., Friedel, S., Lichtner, P., Fontenla-Horro, F., Wudy, S., Hagemann, S., Gortner, L., Huse, K., Remschmidt, H., Bettecken, T., Meitinger, T., Schafer, H., Hebebrand, J., Hinney, A. (2004). Ghrelin receptor gene : identification of several sequence variants in extremely obese children and adolescents, healthy normal-weight and underweight students, and children with short normal stature. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 157-162.
- Wellman, M., Abizaid, A. (2015). Growth Hormone Secretagogue Receptor Dimers : A New Pharmacological Target(1,2,3). *eNeuro*, 2.
- Willeesen, M.G., Kristensen, P., Romer, J. (1999). Colocalization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*, 70, 306-316.
- Williams, G., Bing, C., Cai, X.J., Harrold, J.A., King, P.J., Liu, X.H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis : different circuits, different purposes. *Physiol Behav*, 74, 683-701.

- Wortley, K.E., Anderson, K.D., Garcia, K., Murray, J.D., Malinova, L., Liu, R., Moncrieffe, M., Thabet, K., Cox, H.J., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J., and Sleeman, M.W. (2004). Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 8227-8232.
- Wortley, K.E., del Rincon, J.P., Murray, J.D., Garcia, K., Iida, K., Thorner, M.O., Sleeman, M.W. (2005). Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *J Clin Invest*, 115, 3573-3578.
- Wren, A.M., Small, C.J., Ward, H.L., Murphy, K.G., Dakin, C.L., Taheri, S., Kennedy, A.R., Roberts, G.H., Morgan, D.G., Ghatei, M.A., Bloom, S.R. (2000). The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, 141, 4325-4328.
- Wren, A.M., Small, C.J., Fribbens, C.V., Neary, N.M., Ward, H.L., Seal, L.J., Ghatei, M.A., Bloom, S.R. (2002). The hypothalamic mechanisms of the hypophysiotropic action of ghrelin. *Neuroendocrinology*, 76, 316-324.
- Xie, T.Y., Ngo, S.T., Veldhuis, J.D., Jeffery, P.L., Chopin, L.K., Tschop, M., Waters, M.J., Tolle, V., Epelbaum, J., Chen, C., Steyn, F.J. (2015). Effect of Deletion of Ghrelin-O-Acyltransferase on the Pulsatile Release of Growth Hormone in Mice. *J Neuroendocrinol*, 27, 872-886.
- Yang, J., Brown, M.S., Liang, G., Grishin, N.V., Goldstein, J.L. (2008). Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*, 132, 387-396.
- Yi, C.X., Heppner, K.M., Kirchner, H., Tong, J., Bielohuby, M., Gaylinn, B.D., Muller, T.D., Bartley, E., Davis, H.W., Zhao, Y., Joseph, A., Kruthaupt, T., Ottaway, N., Kabra, D., Habegger, K.M., Benoit, S.C., Bidlingmaier, M., Thorner, M.O., Perez-Tilve, D., Tschop, M.H., Pfluger, P.T. (2012). The GOAT-ghrelin system is not essential for hypoglycemia prevention during prolonged calorie restriction. *PLoS One*, 7, e32100.
- Yildiz, B.O., Suchard, M.A., Wong, M.L., McCann, S.M., Licinio, J. (2004). Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 10434-10439.
- Yin, Y., Li, Y., Zhang, W. (2014). The growth hormone secretagogue receptor : its intracellular signaling and regulation. *Int J Mol Sci*, 15, 4837-4855.
- 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.
- Zhang, J.V., Klein, C., Ren, P.G., Kass, S., Ver Donck, L., Moechars, D., Hsueh, A.J. (2007). Response to Comment on "Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake". *Science*, 315, 766.
- Zhang, W., Chai, B., Li, J.Y., Wang, H., Mulholland, M.W. (2008). Effect of des-acyl ghrelin on adiposity and glucose metabolism. *Endocrinology*, 149, 4710-4716.
- Zhao, T.J., Liang, G., Li, R.L., Xie, X., Sleeman, M.W., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (2010). Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 7467-7472.
- Zigman, J.M., Nakano, Y., Coppari, R., Balthasar, N., Marcus, J.N., Lee, C.E., Jones, J.E., Deysher, A.E., Waxman, A.R., White, R.D., Williams, T.D., Lachey, J.L., Seeley, R.J., Lowell, B.B., Elmquist, J.K. (2005). Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest*, 115, 3564-3572.
- Zigman, J.M., Jones, J.E., Lee, C.E., Saper, C.B., Elmquist, J.K. (2006). Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol*, 494, 528-548.
- Zigman, J.M., Bouret, S.G., Andrews, Z.B. (2016). Obesity Impairs the Action of the Neuroendocrine Ghrelin System. *Trends Endocrinol Metab*, 27, 54-63.
- Zizzari, P., Halem, H., Taylor, J., Dong, J.Z., Datta, R., Culler, M.D., Epelbaum, J., Bluet-Pajot, M.T. (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.
- Zizzari, P., Longchamps, R., Epelbaum, J., Bluet-Pajot, M.T. (2007). Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology*, 148, 1648-1653.