

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA  
UNIVERSITE DE TOURS



FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquées  
Unité Physiologies de la Reproduction et des Comportements  
Ecole Doctorale : SSBCV



# THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat  
Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire

## THEME

# Implication de la Ghréline et des Cellules-Souches Neurales dans la Réversion de la Cachexie Cancéreuse avec ou sans Expansion Tumorale

Présentée par: Mme MERABET Nesrine

### Membres de Jury :

Mr FRIH Hacène

Prof. Univ. Annaba

Président de jury

Mme BERREDJEM Hajira

Prof. Univ. Annaba

Directrice de thèse

Mr MOYSE Emmanuel

Prof. Univ. Tours

Directeur de thèse

Mme CORONAS Valérie

Prof. Univ. Poitiers

Examinatrice

Mr REZGOUNE Mohamed Larbi

MCA Univ. Constantine

Examineur

Mme MONNIER Véronique

MC Univ. Diderot

Examinatrice

Année universitaire: 2023 / 2024



Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une cotutelle internationale entre l'Université Badji Mokhtar-Annaba, Algérie et l'Université de Tours, France, et soutenue par une bourse de mobilité internationale Profas B+ pour une durée de trois années

Ce travail a été également soutenu financièrement par le ministère Algérien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, dans le cadre du projet de recherche national PRFU : D01N01UN230120200005, l'Institut de psychiatrie et de neurosciences de Paris (IPNP), INSERM U1266, 75014, Paris (France), le Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquées de l'UBMA (Algérie) et l'Unité 85 PRC (Physiologie de la Reproduction et du Comportement), Centre INRAe de Tours, 37380 Nouzilly, (France).

## REMERCIEMENTS

Après plusieurs années de péripéties, de moments de doute, de fatigue et de lassitude, nous y voilà, et comme dit le proverbe « Tout vient à point à qui sait attendre ».

Le présent travail est le fruit d'une collaboration intense entre plusieurs équipes de recherche, aussi je tiens à remercier toutes les structures ayant permis l'accomplissement de cette étude, à savoir l'Université Badji Mokhtar d'Annaba, et l'Université de Tours ; ce fut un réel plaisir d'évoluer dans ces conditions de mutualité, de respect et d'échange.

J'adresse en premier lieu mes plus vifs remerciements à ma directrice de thèse, sans laquelle je n'aurais pas eu la chance d'avoir le poste de doctorante, et réaliser ce beau projet scientifique, Mme Hajira Berredjem, Professeur à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba et directrice du laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquées, pour son accompagnement sans faille durant toutes ces années, ses compétences professionnelles et intellectuelles, son appétence pour la science et ses conseils avisés, elle a su me soutenir sur tous les domaines. Je la remercie de tout cœur.

Ce travail de recherche n'aurait jamais vu le jour sans la famille scientifique, qui m'a accueillie à bras ouverts de l'autre côté de la méditerranée, à savoir mon directeur de thèse, M. Emmanuel Moyse, Professeur à l'université de Tours et chercheur au laboratoire INSERM de Tours, France, à ma co-encadrante Mme Virginie Tolle, Docteur et chercheur au laboratoire IPNP à l'Université Paris Descartes, France. Ces années passées à leurs côtés ont été source d'un intarissable savoir dans de multiples disciplines, j'ai bénéficié grâce à eux d'une formation de

choix dans le domaine des neurosciences et du comportement alimentaire. Je ne les remercierais jamais assez pour leur compréhension et leur patience.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent au Pr. Hacène Frih qui nous fait l'honneur de présider le jury.

J'exprime ma considération distinguée et ma profonde gratitude aux membres du Jury, Pr Coronas, Dr Monnier et Dr Rezgoune qui ont accepté d'examiner ce travail avec bienveillance.

Je tiens également à remercier M. Nicolas Ramoz, Docteur et chercheur au laboratoire IPNP à l'université Paris Descartes, France, dont l'aide a contribué d'une manière indéniable à la réussite de ce travail.

J'exprime ma reconnaissance à M. Omar Djefal, Docteur Uro-chirurgien à Annaba, qui m'a été d'une aide précieuse dans l'accomplissement de ma recherche.

Je ne pourrais oublier de remercier l'ensemble des enseignants du département de Biochimie, qui ont enrichi par leur savoir et leurs qualités humaines mon cursus universitaire.

Un grand merci à Dr Asma Bourefis et Mme Marwa Benabdelkrim pour leur aide expérimentale de biologie moléculaire et tout particulièrement Mme Amel Boulmaiz pour sa précieuse aide dans l'utilisation du software MDR. Merci également pour vos encouragements et votre soutien moral.

J'ai dû malencontreusement oublier des personnes dans la foulée, aussi je remercie toute personne qui a contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

# DEDICACES

*Je dédie ce mémoire à mes très chers parents  
J'espère ne jamais vous décevoir et toujours vous rendre fiers*

## ***A ma bien aimée mère***

*Je suis née bordée par ton amour inconditionnel, De tes bras, tu  
m'as bercée, De tes mots, tu m'as consolée,  
Par ton attitude sereine, tu m'as donnée confiance,  
Et sous ton bienveillant regard, voilà que j'affronte la vie,  
Les joies, les peines et les soucis. Aujourd'hui est un jour béni,  
Celui où je t'adresse mille mercis et milles excuses pour toutes les  
peines que j'ai pu te causer.  
Sans toi je n'aurai jamais pu arriver à ce stade-là.*

## ***A mon cher père***

*A toi, mon père, l'homme au cœur tendre, pour moi tu es unique  
Tu as travaillé tellement dure pour que mes frères et moi même  
puissions vivre à notre aise et réaliser nos rêves.  
Je sais qu'à ta façon tu veux tout ce qu'il y a de mieux pour  
nous, on se ressemble tous les deux, tel père, telle fille et  
j'en suis fière.  
J'estime logique de te rendre le même amour que celui que tu m'as  
donnée tout au long de ma vie, merci pour tout*

## ***A mon grand frère***

*Pour qui j'ai été un exemple de sérieux, malgré la distance qui nous sépare, tu es toujours dans toutes mes pensées, Loin des yeux mais près du cœur, je ne te souhaite que de la réussite et du bonheur*

## ***A mon petit frère***

*Depuis le berceau nous avons su que tu allais nous faire suer, toi le petit dernier, mais tu es celui qui m'a toujours admiré et fais rire quand j'en avais besoin, je serai toujours là pour toi.*

## ***A ma petite sœur***

*Dès ton arrivée au monde, je n'ai plus été la fille unique de la famille et j'en étais très heureuse, j'ai une sœur à qui je raconterai mes secrets, ma confidente qui sera toujours là pour moi, tu as su remplir ce rôle avec brio, malgré ton jeune âge, tu as toujours été plus logique et plus rationnelle que moi, tu m'as conseillé et admiré comme personne*

## ***A Loulou***

*Tu as toujours eu confiance en mes compétences, tu as cru en moi quand je ne le faisais plus, tu m'as encouragé quand je baissais les bras, tu as stressé à ma place lors de mes examens, tu m'as poussé à donner le meilleur de moi-même et ce, depuis notre rencontre.  
Je ne te remercierai jamais assez et j'espère que nous aurons beaucoup de bonheur dans notre nouvelle vie ensemble*

## ***A mes grands parents***

*Qu'ils soient morts ou vivants, c'est grâce à eux que j'ai  
pu avoir des parents aussi extraordinaires,  
A ma grand-mère maternelle qui a toujours été présente à chaque instant de ma vie,  
c'est la seule qui me reste aujourd'hui  
et j'espère la garder près de moi encore longtemps inchaAllah*

## ***A ma tante chérie***

*Aussi loin que je me souviens tu as toujours été proche de moi, tu n'a jamais raté un  
examen, ni un anniversaire tu es une amie plus qu'une tante, j'ai de la chance de t'avoir,  
reste surtout comme tu es ; je t'aime beaucoup*

## ***A ma meilleure amie***

*Yasmine qui a toujours été à mes côtés dans les moments joyeux comme dans les pires  
moments. Malgré mes défauts elle m'a toujours accepté, tu es mon  
Amie d'enfance et j'espère de toute une vie.*

Liste des figures  
Listes des tableaux  
Abréviations  
Résumés

## *1<sup>ère</sup> partie : Synthèse Bibliographique*

Introduction .....	1
<b>I. La régulation de la prise alimentaire et de l'appétit .....</b>	<b>1</b>
<b>II. La ghréline .....</b>	<b>5</b>
<b>1- Découverte de la ghréline .....</b>	<b>5</b>
<b>2- Structure moléculaire de la ghréline .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 La préproghréline .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Structure et synthèse de la ghréline .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 Les peptides dérivés de la préproghréline .....</b>	<b>8</b>
<b>2.4 Comparaison de la structure de la ghréline entre les espèces .....</b>	<b>9</b>
<b>3- Le récepteur de la ghréline .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Structure et clonage du GHS-R .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Distribution anatomique des récepteurs de ghréline .....</b>	<b>12</b>
<b>3.3 Voies de signalisation intracellulaires .....</b>	<b>13</b>
<b>4- Rôles physiologiques de la ghréline .....</b>	<b>14</b>
<b>4.1 Effet sur la prise alimentaire .....</b>	<b>15</b>
<b>4.2 Effets de la ghréline sur la sécrétion de GH .....</b>	<b>16</b>
<b>4.3 Effets sur la prolifération cellulaire .....</b>	<b>17</b>
<b>5- Les mimétiques synthétiques de la ghréline .....</b>	<b>18</b>
<b>III. Les cellules-souches neurales des Mammifères adultes .....</b>	<b>20</b>
<b>1. Mise en évidence et définitions .....</b>	<b>20</b>
<b>2. La niche neurogénique du complexe vagal .....</b>	<b>22</b>
<b>3. Les effets de la ghréline sur les cellules-souches neurales .....</b>	<b>23</b>
<b>IV. Pathologies liées aux dérégulations de l'équilibre énergétique .....</b>	<b>24</b>
<b>1. L'obésité .....</b>	<b>24</b>
<b>2. L'anorexie .....</b>	<b>25</b>
<b>3. La cachexie cancéreuse .....</b>	<b>25</b>

V. Ghréline et cancer de la prostate .....	27
1. Description anatomique et histologique de la prostate .....	27
1.1. Chez l'Homme .....	27
1.2. Chez les Rongeurs .....	30
1.3. Les cellules-souches de l'épithélium prostatique .....	31
2. Rôle physiologique de la prostate .....	32
3. Physiopathologie de la prostate .....	33
3.1. La prostatite .....	33
3.2. L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) .....	33
3.3. Le cancer de la prostate .....	33
3.3.1. Épidémiologie du Cancer de la Prostate .....	38
3.3.2. Les facteurs de risque du cancer de la prostate .....	40
3.3.3. Diagnostic du cancer de la prostate .....	40
3.3.4. Traitement du cancer de la prostate .....	44
3.3.5. Mécanismes moléculaires de la cancérogénèse prostatique .....	45
4. Rôle de la ghréline dans le cancer de la prostate .....	47
4.1. Polymorphisme SNP et haplotypes .....	51
VI. Objectif de thèse .....	56

## *2<sup>ème</sup> partie : Matériel et méthodes*

### **PREMIERE PARTIE**

I. Agonistes de ghréline et agents pharmacologiques .....	57
II. Culture primaire de cellules-souches neurales d'AP de Souris .....	58
1- Animaux et prélèvements tissulaires .....	58
2- Dissociation cellulaire et mise en culture .....	58
III. Culture primaire de cellules-souches de prostate de Souris .....	60
1- Animaux et prélèvements tissulaires .....	60

2- Dissociation cellulaire et mise en culture .....	60
<b>IV. RT-qPCR .....</b>	<b>62</b>
1- Extraction d'ARN .....	62
2- Reverse transcription .....	63
3- Amplification d'une séquence-cible par polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) .....	63
<b>V. Analyse <i>in vivo</i> du comportement alimentaire de Souris .....</b>	<b>65</b>
1- Utilisation des cages métaboliques .....	65
2- Protocole expérimental <i>in vivo</i> .....	65
<b>VI. Immunohistochimie du BrdU incorporé <i>in vivo</i> .....</b>	<b>66</b>
1- Réalisation des coupes sériées d'AP au cryostat .....	66
2- Immunohistochimie BrdU .....	67

## DEUXIEME PARTIE

1. Population et collecte des données .....	68
2. Confidentialité et considérations éthiques .....	68
3. Extraction d'ADN .....	68
4. Génotypage SNP TaqMan® .....	69
5. Analyses statistiques des données .....	71

## *3<sup>ème</sup> Partie : Résultats*

### PREMIERE PARTIE

1- Croissance des neurosphères d'area postrema de souris adulte .....	73
2- Courbe dose-réponse du JMV-2894 sur les neurosphères d'AP de Souris adulte ...	73
3- Expression de la cycline D1 par les neurosphères d'AP de souris adulte .....	74
4- Expression du récepteur de la ghréline GHSR-1a par les neurosphères d'AP de Souris adulte .....	75
5- Effets <i>in vivo</i> de la ghréline et du JMV sur la prise alimentaire chez la souris .....	77
6- Effet <i>in vivo</i> du BrdU sur la prise alimentaire induite par le JMV .....	78

7- Effet <i>in vivo</i> du Brdu sur la prise alimentaire induite par la ghréline .....	79
8- Effets de JMV et de ghréline sur le pattern des repas .....	80
9- Effet du JMV-2894 et de la ghréline sur la neurogenèse <i>in vivo</i> .....	82
10- Effet du JMV-2894 sur les cellules-souches d'épithélium de prostate <i>in vitro</i> .....	83

## DEUXIEME PARTIE

1- Description de la population d'étude .....	85
2- Equilibre de Hardy Weinberg .....	86
3- Association des SNPs <i>GHRL</i> et <i>GHS-R</i> avec le risque de CaP .....	86
4- Analyse des haplotypes de <i>GHRL</i> et <i>GHS-R</i> .....	89
5- Analyse du déséquilibre de liaison des SNPs <i>GHRL</i> et <i>GHS-R</i> .....	90
6- Relation entre les polymorphismes des gènes <i>GHRL</i> , <i>GHS-R</i> et l'IMC .....	91
7- Evaluation des interactions gène/gène et gène/environnement : résultats <i>Multifactor Dimensionality Reduction</i> (MDR) .....	97
7.1. Interactions Gène-Gène .....	97
7.2. Interactions Gène-Environnement .....	100

## *4<sup>ème</sup> Partie : Discussion et Conclusion*

Discussion .....	104
<b>PREMIERE PARTIE</b> .....	104
<b>DEUXIEME PARTIE</b> .....	107
Conclusion.....	118
Références Bibliographiques.....	120
Annexe.....	150

## *Liste des figures*

N°	Titres	Pages
<b>1</b>	La régulation de la prise alimentaire à l'échelle de l'organisme .....	<b>2</b>
<b>2</b>	L'intégration des signaux de satiété et d'adiposité par le cerveau .....	<b>4</b>
<b>3</b>	Les neurones orexigènes et aorexigènes du noyau arqué de l'hypothalamus .....	<b>4</b>
<b>4</b>	Gène de la pré proghréline synthétisant la ghréline et l'obéstatine .....	<b>7</b>
<b>5</b>	Structure de la ghréline octanoylée .....	<b>8</b>
<b>6</b>	Les différentes formes de ghréline issues de la préproghréline et leurs actions biologiques	<b>9</b>
<b>7</b>	Formes majoritaires de ghréline chez l'homme et le rat/souris .....	<b>10</b>
<b>8</b>	Acides aminés de la ghréline conservés entre différentes espèces animales .....	<b>10</b>
<b>9</b>	Le récepteur de la ghrélines .....	<b>12</b>
<b>10</b>	Stades de la cachexie cancéreuse .....	<b>26</b>
<b>11</b>	Rôle de la signalisation inflammatoire dans l'évolution vers la cachexie .....	<b>27</b>
<b>12</b>	Représentation schématique des coupes frontales et sagittales de l'appareil urogénital mâle indiquant la position anatomique de la prostate adulte .....	<b>28</b>
<b>13</b>	Anatomie et structure histologique de la prostate humaine .....	<b>29</b>
<b>14</b>	Structure anatomique de la prostate .....	<b>30</b>
<b>15</b>	Histo-cytologie de la prostate de rongeur adulte mâle .....	<b>31</b>
<b>16</b>	Processus en trois phases (initiation, promotion et progression) suite à l'administration d'un agent cancérigène à des modèles animaux de cancers primitifs .....	<b>35</b>
<b>17</b>	L'atrophie inflammatoire proliférative comme précurseur de la néoplasie intraépithéliale prostatique (PIN) et du cancer de la prostate .....	<b>36</b>
<b>18</b>	Principales voies de signalisation dans la métastase osseuse du cancer de la prostate .....	<b>37</b>
<b>19</b>	a) Nombre des nouveaux cas de cancer chez les deux sexes en France. (b) Nombre des nouveaux cas de cancer chez l'homme en France. (c) Estimation des taux d'incidence et de mortalité en France .....	<b>38</b>
<b>20</b>	(a) Nombre des nouveaux cas de cancer chez les deux sexes en Algérie. (b) Nombre des nouveaux cas de cancer chez l'homme en Algérie.(c) Estimation des taux d'incidence et de mortalité en Algérie .....	<b>39</b>
<b>21</b>	Vue schématique de l'histologie prostatique selon la classification de Gleason .....	<b>42</b>
<b>22</b>	Présentation générale de la prise en charge du CaP .....	<b>44</b>
<b>23</b>	Voies impliquées dans la progression néoplasique du CaP à partir de l'épithélium prostatique. Les différentes étapes de la carcinogénèse prostatique sont représentées et	

	associées avec les différents processus biologiques et altérations moléculaires .....	<b>46</b>
<b>24</b>	La pathogénèse moléculaire du cancer de la prostate .....	<b>47</b>
<b>25</b>	Modèle proposé illustrant les voies par lesquelles l'axe de la ghréline exerce des effets prolifératifs sur les cellules cancéreuses .....	<b>49</b>
<b>26</b>	L'effet médié par la ghréline, systémique et/ou produite localement, sur la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate .....	<b>50</b>
<b>27</b>	a) Prépro-ghréline (chromosome 3p25.3). Les polymorphismes communs du gène de la ghréline (GHRL) et les variantes rares rapportés dans la littérature. b) GHSR (chromosome 3q26.31). Gène du récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance (GHSR) : polymorphismes communs et variants rares rapportés dans la littérature .....	<b>53</b>
<b>28</b>	Face dorsale du tronc cérébral sous loupe binoculaire [barre d'échelle, 1mm] ; (b) : Coupe transversale du tronc cérébral en histofluorescence des cellules nestine-positives de souris transgéniques, face dorsale en haut, centrée sur l'AP .....	<b>58</b>
<b>29</b>	Culture de neurosphères d'AP .....	<b>60</b>
<b>30</b>	Culture de prostasphères de Souris .....	<b>62</b>
<b>31</b>	Protocole de collecte des sections transversales sériées de cerveau postérieur, par séries de 5 lames numérotées de [1+i] à [5+i]. Chaque section est représentée par un ovale, et les numéros sont ceux de l'ordre chronologique de réalisation/prélèvement sur le rasoir .....	<b>66</b>
<b>32</b>	Principe du TaqMan .....	<b>70</b>
<b>33</b>	Culture de neurosphères III d'AP .....	<b>73</b>
<b>34</b>	Courbe des réponses du JMV-2894 sur les neurosphères d'AP .....	<b>74</b>
<b>35</b>	Test PCR de l'expression de la Cycline D1 par les NSCs d'embryon et d'AP de souris adulte .....	<b>75</b>
<b>36</b>	Quantification par RTqPCR de l'expression du GHSR-1a par les neurosphères II d'AP .....	<b>75</b>
<b>37</b>	Prise alimentaire quotidienne 4h après injection sous cutanée de NaCl ou de JMV 2894	<b>77</b>
<b>38</b>	Prise alimentaire quotidienne 4h après injection sous cutanée de NaCl ou de ghréline .....	<b>77</b>
<b>39</b>	Prise alimentaire 4h après injection Brdu sur 7J .....	<b>78</b>
<b>40</b>	Prise alimentaire après 4h sans injection Brdu sur 7J .....	<b>78</b>
<b>41</b>	Prise alimentaire 24h après injection Brdu sur 7J .....	<b>78</b>
<b>42</b>	Prise alimentaire sur 24h sans injection Brdu sur 7J .....	<b>78</b>
<b>43</b>	Prise alimentaire 4h après injection Brdu sur 7J .....	<b>79</b>
<b>44</b>	Prise alimentaire sur 4h sans injection de Brdu sur 7J .....	<b>79</b>
<b>45</b>	Prise alimentaire sur 24h après injection sur 7J .....	<b>79</b>
<b>46</b>	Prise alimentaire sur 24h sans injection de Brdu sur 7J .....	<b>79</b>

<b>47</b>	Nombre de repas sur 24h .....	<b>80</b>
<b>48</b>	Quantité d'un repas sur 24h .....	<b>80</b>
<b>49</b>	Durée d'un repas sur 24h .....	<b>80</b>
<b>50</b>	Durée de latence avant le premier repas après l'injection .....	<b>80</b>
<b>51</b>	Nombre de repas sur 24h .....	<b>81</b>
<b>52</b>	Quantité d'un repas sur 24h .....	<b>81</b>
<b>53</b>	Durée d'un repas sur 24h .....	<b>81</b>
<b>54</b>	Durée de latence avant le premier repas après l'injection .....	<b>81</b>
<b>55</b>	Marquage de noyaux Brdu .....	<b>82</b>
<b>56</b>	Effet du JMV sur la neurogenèse .....	<b>83</b>
<b>57</b>	Effet de la Ghréline sur la neurogènese .....	<b>83</b>
<b>58</b>	Une prostasphère primaire à 6 jours de culture. Barre d'échelle 100 µm .....	<b>84</b>
<b>59</b>	Courbe dose réponse du JMV-2894 sur les prostato-sphères .....	<b>84</b>
<b>60</b>	Courbes de survie globale pour la survenue de décès des patients CaP selon les génotypes (A) GHRL et (B) GHS-R .....	<b>89</b>
<b>61</b>	Degré de DL des SNPs de GHRL block 1 et GHS-R block 2 .....	<b>98</b>
<b>62</b>	Distribution de l'IMC chez les patients atteints du CaP en fonction (A) du score de Gleason et (B) des grades .....	<b>92</b>
<b>63</b>	Distribution des patients selon l'IMC et les génotypes des SNPs du gène GHRL .....	<b>94</b>
<b>64</b>	Distribution des patients selon l'IMC et les génotypes des SNPs du gène GHS-R .....	<b>94</b>
<b>65</b>	Courbe de survie globale pour la survenue de décès des patients atteints de CaP .....	<b>95</b>
<b>66</b>	Résumé des modèles d'interaction par réduction de la dimensionnalité multifactorielle (MDR) .....	<b>99</b>
<b>67</b>	Résumé des modèles d'interaction par réduction de la dimensionnalité multifactorielle (MDR) .....	<b>101</b>
<b>69</b>	Résumé des modèles d'interaction par réduction de la dimensionnalité multifactorielle (MDR) .....	<b>103</b>

## *Liste des tableaux*

N°	Titres	Pages
<b>1</b>	Différents mimétiques de la ghréline et leurs fonctions .....	<b>19</b>
<b>2</b>	Evaluation de l'agressivité du cancer de la prostate selon la classification de D'Amico .....	<b>43</b>
<b>3</b>	Ensemencement des cellules dans une plaque de culture 24 puits .....	<b>59</b>
<b>4</b>	Séquences des amorces utilisées .....	<b>64</b>
<b>5</b>	Caractéristiques des SNPs étudiés .....	<b>71</b>
<b>6</b>	Résultats de normalisation des données de la PCR en temps réel .....	<b>76</b>
<b>7</b>	Caractéristiques démographiques et cliniques des groupes d'étude .....	<b>85</b>
<b>8</b>	HWE pour les SNPs GHRL (rs696217, rs4684677et rs34911341) et GHS-R (rs2922126, rs572169 et rs2948694) dans le groupe malade .....	<b>86</b>
<b>9</b>	Distribution allélique et analyse d'association aux loci du gène GHRL (rs4684677, rs696217 et rs34911341) et GHSR (rs2922126, rs572169 et rs2948694) chez les patients CaP et les témoins sains .....	<b>87</b>
<b>10</b>	Distribution génotypique aux loci du gène GHRL (rs4684677, rs696217 et rs34911341) et GHS-R (rs2922126, rs572169 et rs2948694) chez les patients CaP et les témoins sains .....	<b>88</b>
<b>11</b>	Haplotypes estimés dans la population étudiée .....	<b>90</b>
<b>12</b>	Relation entre les polymorphismes génotypiques de GHRL / GHS-R et L'IMC chez les patients atteints de CaP .....	<b>93</b>
<b>13</b>	Caractéristiques clinico-pathologiques au moment du diagnostic et distribution des IMC chez les patients atteints de CaP .....	<b>96</b>
<b>14</b>	Résultats de l'analyse MDR : interaction gène – gène .....	<b>98</b>
<b>15</b>	Résultats de l'analyse MDR : interaction gène – environnement .....	<b>100</b>
<b>16</b>	Résultats de l'analyse MDR .....	<b>102</b>

## *Liste des abréviations*

**ADN** : (Deoxyribonucleic acid) -acide désoxyribonucléique

**ADT** : (Androgen Deprivation Therapy) - Thérapie de Suppression des Androgènes

**AG**: (Acylated Ghrelin) - Ghréline Acylée

**AgRP** : Agouti-Related Peptide

**AM**: (Anorexia nervosa) - Anorexie mentale

**AR** : (androgen receptor) - Récepteur aux androgènes

**ARE** : (Androgen Response Elements) - Éléments de Réponse aux Androgènes

**ARNm** : (Messenger ribonucleic acid) -acide ribonucléique messenger

**AUDIT** : Alcohol Use Disorders Identification Test

**bFGF** : basic Fibroblast Growth Factor

**BMI** : (Body Mass Index) - Indice de Masse Corporelle

**BMP** : (Bone Morphogenetic Protein) - protéine osseuse morphogénétique

**Brdu** : (Bromodeoxyuridine) - Bromodésoxyuridine

**BSA** :(Bovine Serum Albumin) - Albumine Sérique Bovine

**CART** :(Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript) - Transcript Régulé par la Cocaine et l'Amphétamine

**CCK** : Cholecystokinine la cholécystokinine

**CRPC** : (Castration-Resistant Prostate Cancer) - Cancer de la Prostate Résistant à la Castration

**DMEM** : Eagle's minimal essential medium

**CVD** : (Dorsal Vagal Complex) - Complexe vagal dorsal

**EDTA** : Ethylenediaminetetracetic acid

**EGF** : (Epidermal Growth Factor) - Facteur de Croissance Épidermique

**ER** :(Estrogen Receptor) - Récepteur aux Œstrogènes

**ETS** : (E26 Transformation-Specific) - Transformation Spécifique E26

**GH** : (Growth Hormone) - Hormone de Croissance

**GHRH** : (Growth Hormone-Releasing Hormone) - Hormone de Libération de l'Hormone de Croissance

**GHRL** :(Ghrelin) – Ghréline

**GHS-R** : (Growth Hormone Secretagogue Receptor) récepteur secrétagogue de l'hormone Ghreline

**GHS-R KO** : Knock-out Growth Hormone Secretagogue Receptor

**GOAT** : (Ghrelin-O-Acyl-Transferase)

**GPCR** : (G Protein-Coupled Receptors) - Récepteurs Couplés aux Protéines G

**GPR39** : G protein coupled receptor 39

**HBP** : (Benign prostatic hyperplasia) -Hypertrophie bénigne de la prostate

**HGPIN** : (High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia) - Néoplasie Intraépithéliale Prostatique de Haut Grade

**HWE** : (Hardy-Weinberg Equilibrium) - Équilibre de Hardy-Weinberg

**IGHF-1** : (Insulin-like growth factor-1) facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline

**IGHF-II** : (Insulin-like growth factor-II) facteur de croissance 2 ressemblant à l'insuline

**LD** :(Linkage Disequilibrium) - Déséquilibre de Liaison

**LH** :(Luteinizing Hormone) - Hormone Lutéinisante

**LHA** : (lateral hypothalamic area) - l'aire hypothalamique latérale

**LHRH** : (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone) - Hormone de Libération de l'Hormone Lutéinisante

**M** : (Metastasis)-Métastase

**MTLRP** : Motilin-Related Peptide

**N** : (Nodes)- Gonglions lymphatiques voisins

**NPY** :(Neuropeptide Y) - Neuropeptide Y

**NSCs** :(Neural Stem Cells) - Cellules Souches Neurales

**NTS** :(Nucleus of the Solitary Tract) - Noyau du Tractus Solitaire

**PAP** :(Prostatic Acid Phosphatase) - Phosphatase Acide Prostatique

**PCa ou CaP** : (Prostate Cancer) - Cancer de la Prostate

**PCR** :(Polymerase Chain Reaction) - Réaction de Polymérase en Chaîne

**PIN** : (Prostate Intraepithelial Neoplasia)- néoplasie intrapépithéliale prostatique

**POMC** : (Proopiomelanocortin) - Proopiomélanocortine

**PSA** :(Prostate-Specific Antigen) - Antigène Spécifique de la Prostate

**PTEN** : (Phosphatase and Tensin Homolog) - Phosphatase et Tensine Homologue

**PVN** :(Paraventricular Nucleus) - Noyau Paraventriculaire

**PZ** : (Peripheral Zone) - Zone Périphérique

**RC** : (Odds Ratio) - Rapport de cotes

**RP** : (Radical Prostatectomy) - Prostatectomie Radicale

**RT** : (Radiotherapy) - Radiothérapie

**SG** : (Gleason Score) - Score de Gleason

**SNP** : (Single Nucleotide Polymorphism) - Polymorphisme Mononucléotidique

**SVZ** : (Subventricular Zone) - Zone Sous-Ventriculaire

**T** : (Tumor) - Tumeur

**TA** : (Transcriptional Activator) - Activateur Transcriptionnel

**TCI** : (Temperament and Character Inventory) - L'inventaire du tempérament et du caractère

**TMPRSS2** : Transmembrane protease, serine 2

**TSH** : (Thyroid-Stimulating Hormone) - Hormone Thyroestimulante

**TZ** : (Transition Zone) - Zone de Transition

**UAG** : (Unacylated Ghrelin) - Ghréline Non Acylée

**VMH** : (Ventromedial Hypothalamus) - Noyau Ventromédian de l'Hypothalamus

**VTA** : (Ventral Tegmental Area) - Aire Tegmentale Ventrale

## Résumé

Ma thèse concerne l'effet de la signalisation ghréline sur les cellules-souches neurales du complexe vagal (centre neurovégétatif du cerveau) et sur les cellules-souches de l'épithélium de prostate chez la souris adulte, et sur la prédisposition au cancer de la prostate chez l'Homme. Dans la première partie, nous avons cherché l'action de ghréline et de son agoniste JMV- 2894 sur les cultures primaires de neurosphères d'area postrema et de prostatosphères de Souris adulte, montrant que les deux agonistes stimulent l'autorenouvellement des cellules- souches de ces deux tissus. La RT-qPCR sur ARN extraits de ces sphères a montré que l'effet de la ghréline s'exerce sans variation d'expression de cycline D1 ni de récepteur de ghréline. *In vivo*, en utilisant des cages métaboliques informatisées, nous avons caractérisé le décours de l'effet stimulateur de la ghréline et du JMV-2894 sur la prise alimentaire chez la souris adulte.

Dans une deuxième partie, nous avons effectué une étude génétique dans le but de trouver une association entre les variants des gènes de la ghréline et/ou de son récepteur GHSR-1a et le risque du cancer de la prostate (CaP) dans une population Algérienne. Il s'agit d'une étude d'association des ADN génomiques d'une cohorte de sujets algériens suivis au service d'urologie d'Annaba portant sur les variants génétiques suivantes : rs696217, rs4684677 et rs34911341 (gène *GHRL*) et rs2948694, rs572169 et rs2922126 (gène *GHS-R*). Il s'agit d'une première étude réalisée sur 6 SNPs (*GHRL* et *GHS-R*) dans le cas du CaP. Cette étude a concerné 120 malades et 95 témoins. Les génotypages des SNPs étudiés a été effectué par TaqMan PCR. La distribution des variants, génotypiques et haplotypiques ainsi que le déséquilibre de liaison entre les deux groupes ont été établis grâce au logiciel Haploview. Nous avons également décrit la relation des 6 SNPs avec le phénotype quantitatif IMC dans la population étudiée. D'autre part, nous avons réalisé pour la première fois une approche d'exploration de données MDR (réduction de la dimensionnalité multifactorielle) afin de détecter les interactions gène et environnement (IMC) des SNPs *GHRL/GHS-R* dans le cas du CaP. À notre connaissance, il s'agit du premier rapport sur l'effet d'interaction de l'IMC et le polymorphisme des gènes *GHRL* et *GHS-R* chez les malades CaP. Les résultats ont montré qu'il n'existait aucune différence significative de distribution des fréquences alléliques, génotypiques et haplotypiques des polymorphismes explorés entre les cas et les contrôles ( $p > 0,05$ ). Par ailleurs, nous avons noté une association significative entre le génotype homozygote TT du variant rs2922126 (*GHS-R*) ( $p = 0,040$ ) avec le risque du CaP ( $p = 0,04$ ). Un DL a été

observé entre les variants rs2922126 et rs572169 ( $D' = 0,60$ ). L'analyse MDR a montré une interaction épistatique potentielle entre les SNPs rs572169, rs2922126.

Pour l'interaction *GHRL*-IMC, le modèle rs4684677, rs34911341, IMC est le meilleur.

Pour l'interaction *GHSR*-IMC, Le modèle rs572169, rs2922126, rs2948694, IMC est le meilleur.

En conclusion, Nous n'avons pas trouvé d'association entre les SNPs étudiés et le CaP. Cependant, lorsque les polymorphismes sont analysés de manière combinée par la méthode MDR, une interaction significative peut être identifiée puisque l'effet combiné des deux polymorphismes est plus fort. L'analyse de l'épistasie peut constituer un excellent outil pour identifier les individus présentant un risque élevé de développer le CaP, qui peut servir de cible thérapeutique.

**Mots clé:** cancer de la prostate ; Ghréline ; récepteur de la ghréline ; polymorphismes génétiques ; IMC ; MDR.

## Abstract

My thesis focuses on the impact of ghrelin signaling on the neural stem cells within the vagal complex (neurovegetative center of the brain) and on the stem cells within the prostate epithelium in adult mice, as well as its relevance to the predisposition to prostate in humans. In the first part, we examined in vitro the mode of action of ghrelin and its agonist JMV-2894 on primary cultures of area postrema neurospheres and prostatospheres of adult mice, showing that the two agonists stimulate the self-renewal of the stem cells of these two tissues. RT-qPCR on RNA extracted from these spheres showed that the effect of ghrelin is exerted without variation in the expression of cyclin D1 or ghrelin receptor. In vivo, using computerized metabolic cages, we characterized the course of the stimulatory effect of ghrelin and JMV-2894 on food intake in adult mice.

In a second part, we conducted a genetic study with the aim of identifying an association between variants of the ghrelin genes and/or its *GHSR-1a* receptor and the risk of prostate cancer (PCa) in an Algerian population. This is a case/control association study on the genomic DNA of a cohort of Algerian subjects followed at the Annaba urology department relating to the following genetic variants : rs696217, rs4684677 and rs34911341 (*GHRL* gene) and rs2948694, rs572169 and rs2922126 (*GHS-R* gene). This is a first study conducted on 6 SNPs (*GHRL* and *GHS-R*) in the context of CaP. This study included 120 patients and 95 controls. Genotyping of the SNPs studied was carried out by TaqMan PCR. The distribution of allelic, genotypic and haplotypic frequencies as well as linkage disequilibrium between the two groups were established using Haploview software. We also described the relationship of the 6 SNPs with the quantitative BMI phenotype in the study population. We carried out for the first time an MDR (multifactor dimensionality reduction) data mining approach in order to detect gene- gene and gene-environment (BMI) interactions of *GHRL/GHS-R* SNPs in the case of the CaP. To our knowledge, this is the first report on the interaction effect of BMI and *GHRL* and *GHS-R* gene polymorphism in CaP patients. The results showed that there was no significant difference in the distribution of allelic, genotypic and haplotypic frequencies of the explored polymorphisms between cases and controls ( $p > 0.05$ ). Furthermore, we noted a significant association between the homozygous TT genotype of the rs2922126 (*GHS-R*) variant ( $p = 0.040$ ) with the risk of CaP ( $p = 0.04$ ). A DL was observed between the rs2922126 and rs572169 variants ( $D' = 0.60$ ). MDR analysis revealed a potential epistatic

interaction between SNPs rs572169, rs2922126. For *GHRL*-IMC interaction, rs4684677, rs34911341, IMC model is the best. For *GHS-R*-IMC interaction, rs572169, rs2922126, rs2948694, IMC model is the best. In conclusion, We did not find an association between the SNPs studied and CaP. However, when the polymorphisms are analyzed in a combined manner by the MDR method, a significant interaction can be identified since the combined effect of the two polymorphisms is stronger. Epistasis analysis can be an excellent tool to identify individuals at high risk of developing CaP, which can serve as a therapeutic target.

**Keywords:** prostate cancer ; ghrelin ; ghrelin receptor ; genetic polymorphisms ; BMI ; MDR.

## ملخص

تتعلق أطروحتي بتأثير إشارات الجريلين على الخلايا الجذعية العصبية للمركب المبهم (المركز العصبي الخضري للدماغ) وعلى الخلايا الجذعية لظهارة البروستاتا لدى الفئران البالغة، وعلى الاستعداد للإصابة بسرطان البروستاتا لدى الرجال. في الجزء الأول، قمنا بدراسة تأثير الجريلين وناهضة JMV-2894 على الزراعات الأولية للكرات العصبية اللاحقة للورم وكرات البروستاتا لدى الفئران البالغة، وتبين أن الناهضين يحفزان التجديد الذاتي للخلايا الجذعية لهذين النسيجين. أظهر RT-qPCR على الحمض النووي الريبي (RNA) المستخرج من هذه المجالات أن تأثير الجريلين يمارس دون اختلاف في التعبير عن مستقبلات الجريلين cyclin D1 أو. في الجسم الحي، باستخدام أرقام التمثيل الغذائي المحوسبة، قمنا بتمييز المسار الزمني للتأثير التحفيزي للجريلين و JMV-2894 على تناول الطعام لدى الفئران البالغة.

في الجزء الثاني، أجرينا دراسة وراثية بهدف إيجاد علاقة بين متغيرات جينات الجريلين و/أو مستقبله GHSR-1a وخطر الإصابة بسرطان البروستاتا (PCa) لدى السكان الجزائريين. هذه دراسة ترابطية للحمض النووي الجينومي لمجموعة من الأشخاص الجزائريين الذين تمت متابعتهم في قسم المسالك البولية في غابنة فيما يتعلق بالمتغيرات الوراثية التالية rs696217 و rs4684677 و rs34911341 (GHRL) و rs2948694 و rs572169 و rs2922126 (GHS-R). هذه هي الدراسة الأولى التي أجريت على 6 أشكال (GHRL) SNP و (GHS-R) في حالة CaP. شملت هذه الدراسة 120 مريضاً و95 ضابطاً. تم إجراء الترميز الجيني لل SNPs التي تمت دراستها بواسطة TaqMan PCR. تم إنشاء توزيع المتغيرات الوراثية والنمط الفردي وكذلك اختلال الارتباط بين المجموعتين باستخدام برنامج Haploview. وصفاً أيضاً العلاقة بين 6 SNPs والنمط الظاهري لمؤشر كتلة الجسم الكمي في مجتمع الدراسة. من ناحية أخرى، قمنا لأول مرة بتنفيذ نهج استخراج بيانات MDR لتقليل الأبعاد المتعددة العوامل) من أجل اكتشاف تفاعلات الجينات والبيئة (BMI) لـ GHRL / GHS-R SNPs في حالة CaP. على حد علمنا، هذا هو التقرير الأول عن تأثير التفاعل بين تعدد أشكال الجينات BMI و GHRL و GHS-R لدى مرضى CaP. أظهرت النتائج أنه لا يوجد فرق كبير في توزيع التكرارات الأليلية والوراثية والفرديّة لتعدد الأشكال المستكشفة بين الحالات والضوابط. ( $P > 0.05$ ) علاوة على ذلك، لاحظنا وجود ارتباط كبير بين النمط الجيني TT المتماثل للمتغير (GHS-R) rs2922126 ( $\epsilon = 0.040$ ) مع خطر CaP ( $\epsilon = 0.04$ ). وقد لوحظ وجود DL بين المتغيرات rs2922126 و rs572169 ( $D' = 0.60$ ) أظهر تحليل MDR وجود تفاعل معرفي محتمل بين rs2922126، SNPs rs572169

بالنسبة لتفاعل GHRL-IMC، rs4684677، rs34911341، نموذج IMC هو الأفضل. بالنسبة لتفاعل GHSR-IMC، rs572169، rs2922126، rs2948694، نموذج IMC هو الأفضل.

في الختام، لم نجد علاقة بين تعدد الأشكال المدروسة و CaP. ومع ذلك، عندما يتم تحليل تعدد الأشكال بطريقة مجمعة بواسطة طريقة MDR، يمكن تحديد تفاعل مهم لأن التأثير المشترك لتعدد الأشكال يكون أقوى. يمكن أن يكون تحليل الرعاف أداة ممتازة لتحديد الأفراد المعرضين لخطر كبير لتطوير CaP، والذي يمكن أن يكون بمثابة هدف علاجي.

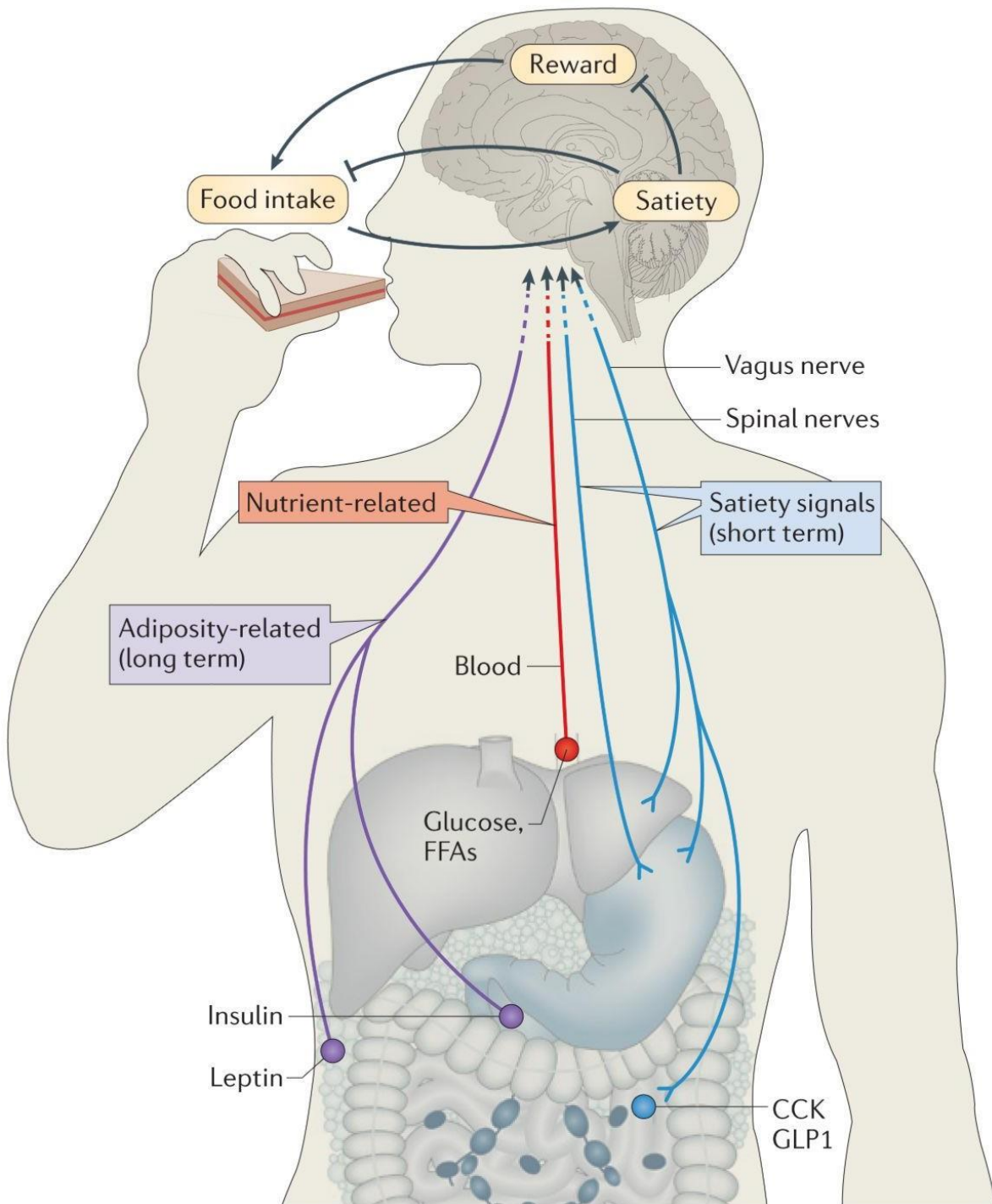
الكلمات المفتاحية: سرطان البروستاتا. جريلين. مستقبلات الجريلين تعدد الأشكال الجينية. مؤشر كتلة الجسم؛ MDR.

# **Synthèse Bibliographique**

La cachexie est la perte de masse musculaire qui est observés au cours de plusieurs maladie tel que l'anorexie et, elle est fréquemment associée aux cancers et qui abaisse la qualité et l'espérance de vie des patients (Baracos et al 2018). Les mécanismes physiopathologiques en sont mal compris et la supplémentation nutritionnelle est inefficace (Hébuterne et al 2014). Dans l'espoir de dégager de nouvelles pistes thérapeutiques, le but de ma thèse était de rechercher sur un modèle animal (souris) si l'hormone ghréline pourrait stimuler l'appétit par l'intermédiaire des cellules-souches neurales du centre-réflexe de satiété : le complexe vagal du cerveau postérieur. En effet, la ghréline est la seule hormone stimulant l'appétit chez les mammifères, mais son administration dans des modèles animaux de cachexie et sur des cohortes de sujets humains a donné des résultats variables et controversés. D'autre part, le centre de la satiété, candidat le plus évident pour la dysfonction causant la cachexie, est le siège d'une neurogenèse à partir de cellules-souches neurales chez les rongeurs adultes (Moyses et al 2006, Lin and Iacovitti 2015), et la neurogenèse adulte a été impliquée dans la régulation de la prise alimentaire (Kokoeva et al 2005).

## **I- La régulation de la prise alimentaire et de l'appétit**

La prise alimentaire quotidienne, mesurée en calories ingérées par jour, est le principal déterminant du poids corporel des mammifères et de ses variations (Morton et al 2014). Le poids corporel, ou plus exactement son évolution en fonction de l'âge, est une constante de l'organisme dans chaque espèce (Kahnau et al 2021). En effet, une manipulation de prise alimentaire imposée à un rongeur adulte pendant 2 semaines, soit à la hausse par gavage, soit à la baisse par privation, entraînent respectivement une hausse ou une baisse de poids corporel qui, après la fin de la période de manipulation, sont suivies d'un retour du poids corporel au même niveau que les témoins nourris *ad libitum* (Ad), et ce par adaptation spontanée de la prise alimentaire dans les semaines suivant la variation imposée (Harris et al 1986). La prise alimentaire est discontinue puisque fractionnée en repas discrets à l'échelle du nyctémère (Rachidi et Moyses 2011). Mais ce sont les paramètres du comportement alimentaire: volume calorique et fréquence des repas qui, en équilibre avec le niveau quotidien d'activité physique et de dépenses énergétiques, constituent les effecteurs essentiels de la régulation du poids corporel.



**Figure 1.** La régulation de la prise alimentaire à l'échelle de l'organisme (Morton et al 2014).

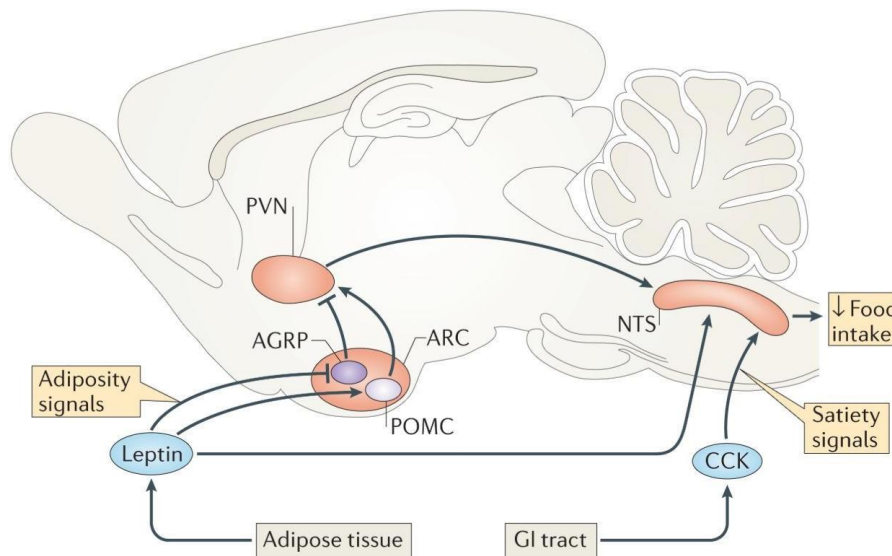
La régulation de la prise alimentaire repose fondamentalement sur deux rétroactions négatives : l'une dite « à court terme » c'est-à-dire à l'échelle temporelle de chaque repas, l'autre « à long terme » à l'échelle de plusieurs repas au moins (Schwartz et al 2000), (Figure1). Ces deux processus régulateurs s'exercent par une diversité de circuits nerveux et

d'hormones, faisant de la « régulation de la prise alimentaire » une grande fonction neuroendocrine.

La rétroaction négative à court terme de la prise alimentaire est constituée par le « réflexe de satiété », à savoir l'interruption réflexe de la prise alimentaire déclenchée par l'activation de la ramification stomacale du nerf vague (10<sup>ème</sup> paire de nerf crânien, élément majeur de l'innervation sensori-motrice des viscères) sous l'effet de la distension mécanique de l'estomac par le bol alimentaire. Ces fibres sensorielles vagues, dont les corps cellulaires se trouvent dans le ganglion noueux proche de la colonne vertébrale cervicale, projettent sur le noyau du tractus solitaire (NTS). Dans ce noyau visérosensoriel multi-fonction du cerveau postérieur (Berthoud et al 2021), les afférences vagues de l'estomac stimulent synaptiquement une projection vers le lobe frontal du cortex cérébral qui inhibe la motivation alimentaire. Lorsque le contenu de l'estomac commence à se vider dans le duodénum, la muqueuse intestinale proximale réagit en sécrétant dans le milieu intérieur une hormone : la cholécystokinine (CCK) qui stimule directement les fibres sensorielles vagues grâce aux récepteurs spécifiques de CCK qu'elles expriment (Figure 1). La cholécystokinine constitue ainsi une « hormone de satiété ». Plusieurs autres hormones gastrointestinales (amyline, Glucagon-like-Peptide-1, Oxyntomoduline, Peptide YY, Polypeptide pancréatique, oleoylethanolamide) sont également activatrices sur les afférences sensorielles vagues de l'estomac, mais de manière secondaire par rapport à la CCK (Neary et Batterham 2009). Le réflexe de satiété est caractérisé par son seuil, ou seuil de satiété, défini comme le volume calorique ingéré pour lequel le repas est spontanément stoppé (Cummings et Overduin 2007).

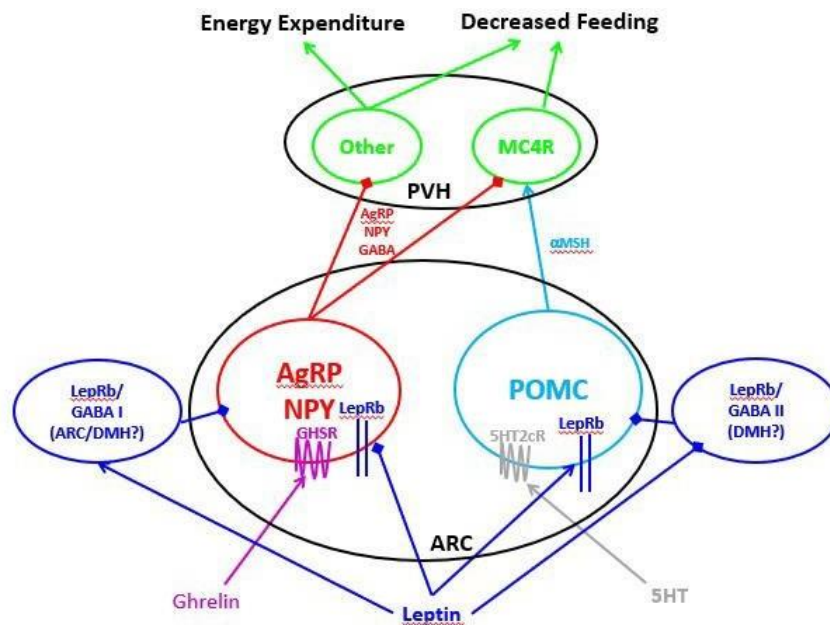
La rétroaction négative à long terme de la prise alimentaire consiste en la variation du seuil de satiété en fonction des besoins énergétiques et du psychisme de l'organisme. Cette intégration modulatrice est réalisée dans l'hypothalamus, qui contrôle le seuil de satiété par une voie nerveuse descendante sur le NTS du complexe vagal (Figure 2), (Morton et al 2014). Le site primaire d'intégration des besoins énergétiques par l'hypothalamus est le noyau arqué (entourant la zone neuro-hémale de l'éminence médiane), grâce à deux sous-populations de neurones à effets fonctionnels opposés sur la prise alimentaire : les neurones orexigènes à co-neurotransmetteurs Neuropeptide Y (NPY) et Agouti-related peptide (AgRP), et les neurones anorexigènes à co-neurotransmetteurs mélanocortine (dérivée du précurseur pro-opio-mélanocortine, (POMC) et cocaïne- and amphetamine-regulated transcript (CART), dont les activités électrophysiologiques provoquent respectivement élévation ou diminution du seuil

de satiété dans le NTS (Affinati et Myers 2021). Ces neurones orexigènes et anorexigènes de l'hypothalamus détectent les besoins énergétiques de l'organisme principalement via les



**Figure 2.** L'intégration des signaux de satiété et d'adiposité par le cerveau (Morton et al 2014).

concentrations plasmatiques des hormones leptine, insuline, ghréline, dont ils expriment les récepteurs à leur surface (Figure 3). Ces neurones répondent aussi aux taux circulants de certains substrats énergétiques et de diverses hormones (Piper et al 2022).



**Figure 3.** Les neurones orexigènes et aorexigènes du noyau arqué de l'hypothalamus (Affinati et Myers 2021).

Leptine et insuline sont secrétées par le tissu adipeux et par le pancréas endocrine respectivement, au pro-rata des réserves adipeuses et des réserves de glycogène hépatique : elles sont donc désignées de « signaux d'adiposité » et ce sont les stimuli majeurs du rétrocontrôle inhibiteur à long-terme de la prise alimentaire (Figure 1), (Morton et al 2006, 2014). Leptine et insuline stimulent l'activité électrophysiologique des neurones anorexigènes à POMC-CART et inhibent l'activité des neurones orexigènes à NPY-AgRP (Figure 3), (Affinati et Myers 2021). La ghréline inversement inhibe l'activité des neurones anorexigènes et stimule l'activité des neurones orexigènes du noyau arqué (Affinati et Myers 2021).

Les neurones NPY-AgRP et POMC-CART du noyau arqué projettent sur quatre autres noyaux de l'hypothalamus : l'aire hypothalamique latérale (LHA), le noyau ventro-médian (VMH), le noyau dorso-médian et le noyau paraventriculaire (PVN), qui par ailleurs reçoivent des afférences du système limbique et projettent aussi sur le NTS vagal. Ces autres noyaux sont causes de l'impact du psychisme et du « système de récompense » sur le seuil de satiété (Figure 3 ), (Affinati et Myers 2021).

Au total, la régulation de la prise alimentaire est organisée par deux centres nerveux interconnectés: la complexe vagal et l'hypothalamus, qui reçoivent et intègrent une diversité de signaux nerveux et humoraux, de provenances systémique et centrale.

## **II- La ghréline**

La ghréline est une hormone stimulatrice d'appétit (ou orexigène), de nature peptidique, qui a été découverte par une approche de pharmacologie inverse à partir de composés thérapeutiques stimulant la sécrétion d'hormone de croissance par l'adénohypophyse.

### **1- Découverte de la ghréline**

La ghréline a été identifiée en tant que ligand naturel des GHS récepteurs Growth Hormone Secretagogue Receptor (GHS-R), récepteurs orphelins connus depuis 1996 (Conn and Bowers 1996) mais pour comprendre l'histoire de sa découverte, il faut revenir un peu dans le temps....

Il y a plus de cent ans, il avait été montré que les extraits hypophysaires étaient capables de stimuler la croissance, mais il a fallu attendre 1971 pour que l'hormone de croissance, Growth hormone (GH) soit isolée (Niall 1971). La *Growth Hormone Releasing Hormone* (GHRH), le facteur hypothalamique responsable de la libération de GH par l'adénohypophyse, a été identifiée en 1982 non pas dans le cerveau mais initialement à partir

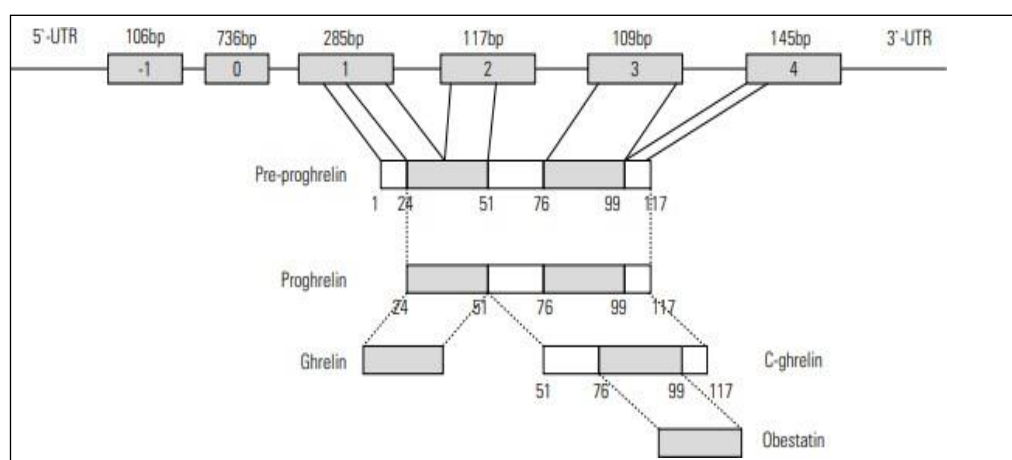
d'une tumeur pancréatique (Guillemin et al 1982). Durant la même période, de nombreux autres peptides ont été découverts et ont été testés sur leur capacité à stimuler l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Il a été montré que les enképhalines (des pentapeptides opioïdes endogènes) pouvaient modifier la libération d'hormones à partir de l'hypophyse, y compris l'hormone lutéinisante ou la TSH. Cependant, (Bowers et al 1977) ont découvert qu'un seul analogue des enképhalines, la met-enképhaline, était susceptible de stimuler la libération de GH. En 1984, des travaux supplémentaires ont permis à cette équipe de mettre en évidence des peptides bien plus efficaces sur la sécrétion de GH et dépourvus d'activité opiacée, incluant le *Growth-Hormone releasing Peptide-6* (GHRP-6), un hexapeptide de synthèse dérivé de la met-enképhaline. Certaines compagnies pharmaceutiques ont développé des analogues du GHRP-6 actifs oralement et qui avaient une efficacité plus importante et une meilleure biodisponibilité. Ces peptides ont été dénommés *Growth Hormone Secretagogue* (GHS). L'un de ces nouveaux composés non peptidiques, le MK-0677, a permis la découverte et le clonage du récepteur des GHS (le GHS-R) à partir d'hypophysés de porc sur la base de son activation du GHS-R qui conduit à l'augmentation des concentrations de calcium intracellulaire détectées dans ce tissu grâce à une sonde bioluminescente dépendante du calcium (Howard et al, 1996). Les études s'intéressant à la distribution du GHS-R ont montré des densités élevées de ce site de liaison dans le complexe hypothalamo-hypophysaire mais également au niveau périphérique, dans les tissus endocrines et non endocrines (Papotti et al 2000) suggérant des fonctions assez larges du GHS-R, bien au-delà du contrôle de la sécrétion de GH. Sur la base de ces connaissances, le ligand endogène du GHS-R, la ghréline, a été découvert en 1999 par un groupe japonais qui a fait une recherche systématique du ligand à partir de différents tissus périphériques par un test biologique consistant en l'induction de flux de calcium dans une lignée cellulaire transfectée avec le GHS-R suivi de chromatographie (Kojima et al 1999), soit presque 20 ans après la caractérisation des premiers GHS synthétiques. L'activation la plus importante du GHS-R était observée à partir d'extraits provenant de l'estomac, et n'était pas retrouvée dans l'hypothalamus (Hosoda et al 2003). Parallèlement à la découverte de la ghréline par l'équipe de Kojima, une autre équipe a montré son homologie avec l'hormone gastro-intestinale déjà connue motiline, ainsi que des homologies entre le récepteur GHS-R et le récepteur de la motiline 44 % d'homologie dans la séquence d'acides aminés (Folwaczny et al 2001) et l'a ainsi nommée MTLRP (Motilin-Related Peptide) (Tomasetto et al 2000).

## 2- Structure moléculaire de la ghréline

### 2.1 La préproghréline

Chez l'homme, le gène de la ghréline est localisé sur le chromosome 3, en 3p25-26. Quatre exons codants et trois introns ont été décrits respectivement en position 141 (2000 bp intron), 258 (3000 bp intron) et 367 (800 pb intron) d'un ADNc de 511 bp. Cet ADNc code pour une protéine de 117 aa : la préproghréline, codée par les exons 2 à 5. L'exon 1 est court puisqu'il ne mesure que 20 paires de bases et il est non codant. Il y a deux sites d'initiation de la transcription donnant donc deux transcrits différents, selon qu'il contient ou non le premier exon. (Figure 4), (Zhang JV et al 2005, Garg A et al 2007)



**Figure 4.** Gène de la pré proghréline synthétisant la ghréline et l'obéstatine (Liu et al 2011)

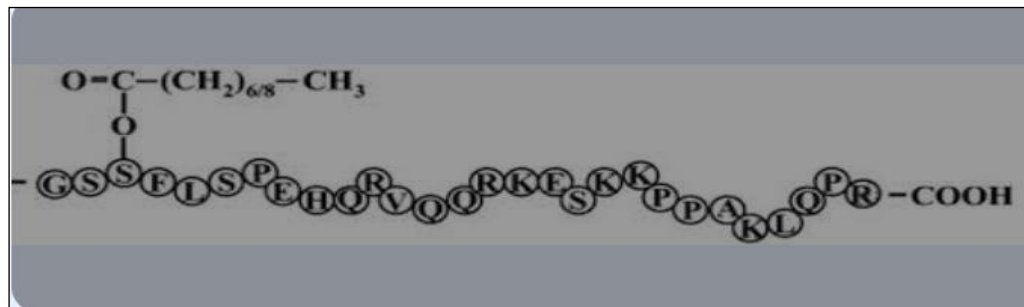
### 2.2 Structure et synthèse de la ghréline

La ghréline dérive de la préproghréline de manière protéolytique. Elle est la seule protéine chez les animaux qui est connue pour être modifiée par O-acylation avec de l'octanoate (C8:0). En effet, différentes formes de ghréline ont été identifiées : une forme dite octanoylée qui présente un résidu n-octanoylé sur la sérine en position 3 et une forme non octanoylée qui représente 80 à 90 % de la forme circulante car essentiellement plus stable (Hosoda et al 2003, Hassouna et al 2017). Plus largement, il peut exister plusieurs types d'acylation observés sur la sérine comme une décanoylation (C10 :0), on parle donc plus généralement de ghréline acylée ou non acylée.

L'octanoylation est nécessaire pour la plupart des actions endocrines de la ghréline (Kojima et Kangawa 2005). On sait que cette modification a lieu dans les cellules productrices puisqu'on y retrouve les deux formes de ghréline. L'octanoylation en position 3 augmente la lipophilie

de la ghréline et joue un rôle important dans son activité biologique *in vivo* et notamment dans la liaison à son récepteur (Van der lely 2004, Kojima and Kongawa 2005, Hosoda et al 2006).

Cette modification post-traductionnelle unique est donc essentielle pour l'effet stimulateur de la ghréline sur la libération de GH et la prise alimentaire et est obtenue par l'action de l'enzyme GOAT (Ghrelin-O-Acyl-Transferase) (Gutierrez et al 2008). Sans cette octanoylation, la ghréline n'est pas reconnue par son récepteur et est donc à priori inactive (Schellekens et al 2012). Toutefois, la forme non octanoylée de ghréline s'est révélée être également biologiquement active en agissant notamment comme un antagoniste fonctionnel de la ghréline octanoylée via un récepteur qui n'a pas encore été identifié (Figure 5).



**Figure 5.** Structure de la ghréline octanoylée (Tounian A et al 2005)

### **2.3 Les peptides dérivés de la préproghréline**

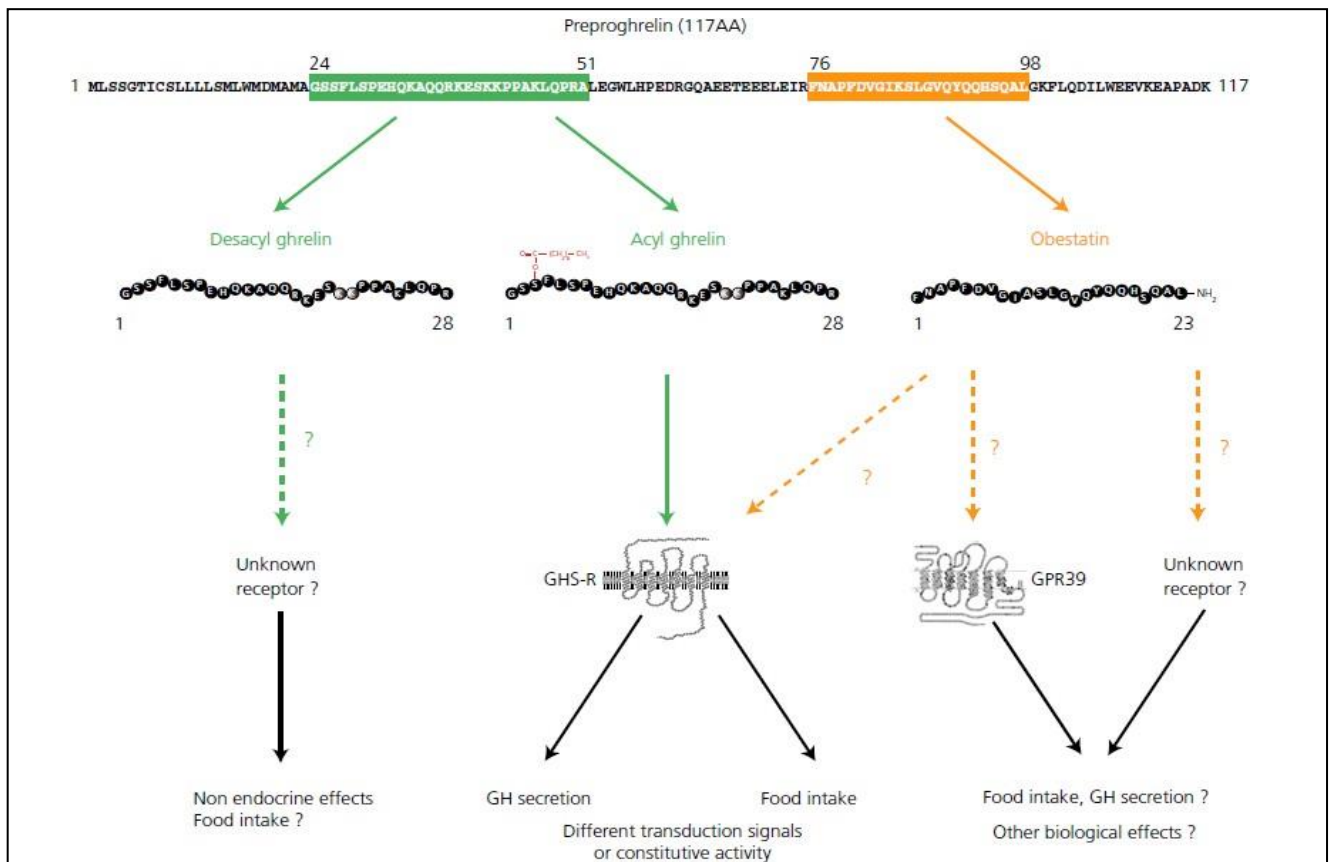
Une partie de l'exon 2 et l'exon 3 codent pour la ghréline, la proghréline ayant un peptide signal de 23 aa et une forme proghréline de 94 aa, dont les 28 premiers constituent codent pour la ghréline (Bluet-Pajot et al 2005). Les quatre ou cinq premiers acides aminés, essentiels pour activer la mobilisation du  $[Ca^{2+}]_i$  par le GHS-R 1a, sont conservés au cours de l'évolution. Un variant d'épissage, aboutissant à la synthèse d'un peptide mature ghréline de 27 acides aminés dépourvu d'un résidu glutamine en position 14, possède les mêmes propriétés que le peptide de 28 acides aminés (Bluet Pajot et al 2005).

La ghréline désacylée est constituée de la même séquence d'acides aminés que la ghréline acylée mais sans acylation en position 3. La forme acylée est rapidement dégradée dans le sang (elle a une demi-vie de 10-12 min) pour donner une forme désacylée qui est plus stable (elle a une demi-vie de 20-30 min) (Tolle et al 2002, Hosoda et al 2004). La forme acylée ne représente donc que 10 à 20% de la ghréline plasmatique totale.

D'autres peptides sont également générés par le clivage du précurseur de la ghréline.

En effet, l'exon 4 code pour un peptide de 23 aa, appelé obestatine, qui a initialement été décrit pour ses effets inhibiteurs sur la prise alimentaire et dont le récepteur n'est pas encore connu (Zhang et al 2005, Garg 2007). Toutefois, les effets physiologiques de ce peptide ont été remis en question et il agirait principalement en antagonisant les effets orexigènes de la ghréline (Zizzari et al 2011).

La C-ghréline est un peptide de 66 aa codés par les exons 3, 4 et 5 (Kojima and Kangawa., 2005). (Figure 6)



**Figure 6.** Les différentes formes de ghréline issues de la préproghréline et leurs actions biologiques (Hassouna et al 2010).

#### 2.4 Comparaison de la structure de la ghréline entre les espèces

De façon intéressante, la structure de la ghréline est fortement conservée parmi les espèces, on note une homologie de structure de 83 % entre le rat et l'homme (Zizzari 2007). Les quatre premiers aa sont conservés chez les primates, les rongeurs, les poissons, les amphibiens et les oiseaux, ce qui suggère un rôle physiologique important de la ghréline (Hosoda H 2007).



### **3. Le récepteur de la ghréline**

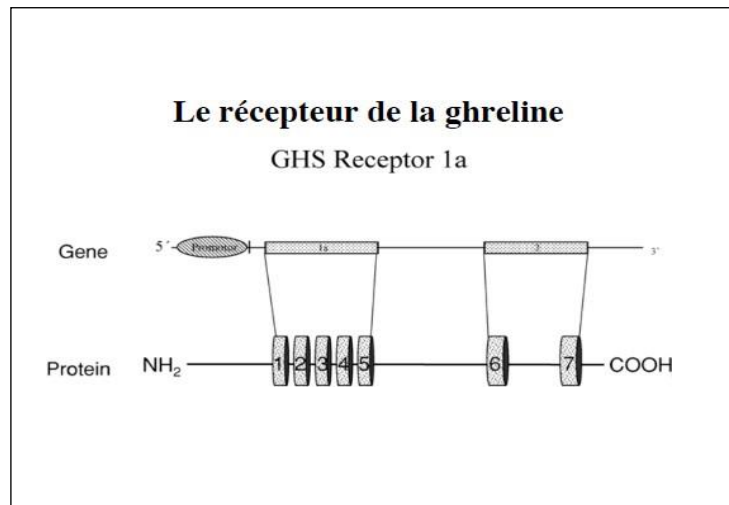
#### **3.1 Structure et clonage du GHS-R**

Le récepteur de la ghréline (GHS-R) appartient à la super-famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G (GPCR). Un nouveau récepteur de cette famille a été cloné à partir de l'hypophyse et de l'hypothalamus médiobasal et s'est avéré être la cible des GHS. Sur la base de sa caractérisation pharmacologique et moléculaire, ce GPCR définit une nouvelle voie neuroendocrine pour le contrôle de la libération pulsatile de GH.

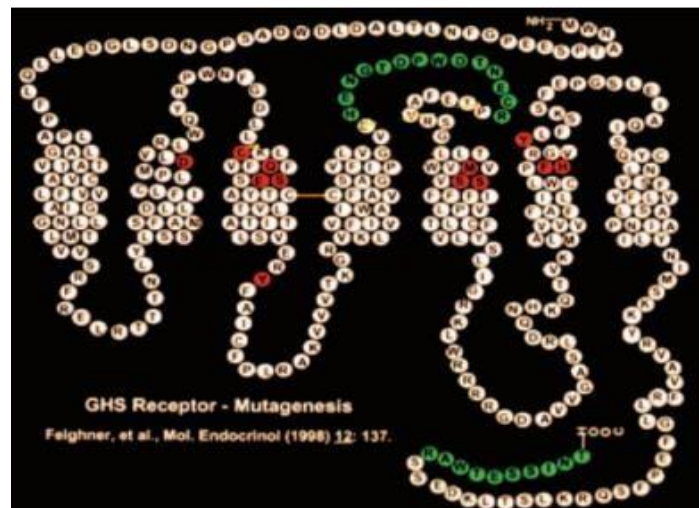
Le gène GHS-R est situé sur le chromosome 3 (3q26-27) chez l'Homme et contient deux exons. Le premier exon code pour les cinq premiers domaines transmembranaires et le deuxième exon code pour les deux derniers. Il existe également deux sites d'épissage à l'origine de deux formes de récepteurs de ghréline: GHS-R1a et GHS-R1b (Howard et al 1996). Le GHSR1a comporte 366 aa pour 41 kd et contient les sept domaines transmembranaires. Le GHSR1b ne mesure que 289 aa car il ne contient que cinq domaines transmembranaires. Tandis que le GHS-R est le récepteur fonctionnel de la ghréline, le sous-types GHS-R1b, issu d'un épissage alternatif, est tronqué, apparemment dépourvu de site de liaison du ligand et est considéré comme inactif. (Leung et al 2007).

Le récepteur de la ghréline présente une homologie de structure avec d'autres récepteurs comme celui de la motiline et le GPR39 dont le ligand est inconnu : il a initialement été caractérisé comme étant le récepteur de l'obéstatine (Zhang et al 2005) mais les études suivantes n'ont pas confirmé cette donnée. En effet, l'équipe de (Chartel et al 2007) ont constaté que l'I125-obéstatin ne se lie pas au GPR39 et n'a observé aucun effet de l'obéstatine sur les cellules transfectées par GPR39 dans divers tests fonctionnels et ont conclu que l'obéstatine n'est pas le ligand apparenté pour GPR39 (Figure 9).

(a)



(b)



**Figure 9.** Le récepteur de la ghreline : (a) : structure génique ; (b) : structure moléculaire (Feighner et al 1998).

### **3.2 Distribution anatomique des récepteurs de ghreline**

Le GHS-R1a est principalement exprimé dans le noyau arqué de l'hypothalamus, mais aussi dans l'hypophyse, le noyau ventromédian, l'hippocampe et la moelle épinière. Dans une moindre mesure, ce récepteur est aussi synthétisé dans l'air tegmental ventrale (Zigman et al. 2006), le cœur, les poumons, le pancréas, l'intestin, le tissu adipeux, les glandes surrénales, la thyroïde et les testicules (Guan et al 1997, Howard et al 1996). Son expression a aussi été observée dans les cellules de la glande mammaire de chèvre en lactation, où la ghreline est

également synthétisée (Zhang et al 2013), suggérant un mode d'action autocrine/paracrine de la ghréline (Zizzari and Bluet- Pajot 2005).

L'expression de l'ARNm du GHS-R a été mise en évidence dans plusieurs noyaux hypothalamiques dont beaucoup sont reconnus depuis longtemps comme jouant un rôle dans la régulation du poids corporel et de la prise alimentaire. Il a également été retrouvé donc les trois régions du complexe vagal dorsal : l'Area postrema, le noyau du tractus solitaire et le noyau moteur dorsal du vague (Zigman et al 2006).

### **3.3 Voies de signalisation intracellulaires**

Le GHS-R1a appartient à la sous-famille des GPCR de type rhodopsine. GHS-R1a interagit avec  $G\alpha q/11$ , qui à son tour recrute la phospholipase C(PLC)- $\beta$  à la membrane et induit la production d'inositol triphosphate (IP3) (Kohno et al 2007). IP3 stimule la libération de  $Ca^{2+}$  du réticulum endoplasmique. La ghréline augmente également le niveau intracellulaire de  $Ca^{2+}$  par influx de l'espace extracellulaire à travers des canaux  $Ca^{2+}$  de type N (Kohno et al 2003) ainsi que la stimulation d'adényl-cyclase et/ou la voie PKC-ERK1/2 (pour revue, Stievenard et al 2017).

La queue C-terminale du GHS-R1a est critique pour l'internalisation des complexes ligand-GHS-R1a, le recrutement de la  $\beta$ -arrestine2 cytosolique et la rétroinhibition ultérieure de la signalisation ligand-GHS-R1a (Holliday et al 2007, Evron et al 2014, Yanagi et al 2018).

Le GHS-R1a peut se lier à des agonistes inverses, c'est-à-dire des molécules qui reconnaissent le récepteur avec spécificité et haute affinité mais qui exercent une action biologique opposée à celle de la ghréline sur les réponses biologiques de ses cellules-cibles (Qin et al 2022).

D'autre part, le GHS-R a une activité constitutive, c'est-à-dire qu'il active constitutivement ses voies de signalisation intracellulaire en l'absence de ligand. L'activité constitutive du GHSR est l'une des plus fortes parmi toute la famille des GPCR, puisqu'elle atteint 50% de l'activation maximale de protéine G dans ses cellules-cibles en l'absence de ghréline (Ringuet et al 2022).

Le GHS-R peut aussi former des hétéromères avec d'autres récepteurs (Holst B et al 2004, Qin et al 2022).

#### **4- Rôles physiologiques de la ghréline**

En accord avec la distribution anatomique très diversifiée de l'expression de la ghréline et de son récepteur, cette hormone est impliquée dans de multiples fonctions biologiques, dont beaucoup sont liées au contrôle de la nutrition. Initialement, ce signal de l'axe tractus-gastro-intestinal / cerveau a été découvert à partir de ses effets directs sur la sécrétion de GH pituitaire, reproduisant les effets connus des sécrétagogues de l'hormone de croissance (GHS). La ghréline et son récepteur ont été fortement conservés pendant l'évolution, soutenant la notion que GHS-R1a et son ligand naturel jouent un rôle fondamentalement important dans la biologie.

La ghréline est sécrétée par l'un des quatre types de cellules endocrines identifiées dans la muqueuse gastrique : les cellules X/A-like (20 %), à côté des cellules ECL (30 %) qui produisent l'histamine, les cellules D (22 %) qui produisent la somatostatine, les cellules entérochromaffines (7 %) qui produisent la sérotonine. On les appelle aussi «cellules à ghréline ». Présentes dès la vie fœtale, ces sont peu nombreuses à la naissance et augmentent progressivement avec l'âge, parallèlement à l'augmentation des taux de ghréline circulante. Elles contiennent à la fois de la ghréline octanoylée et non octanoylée. On les trouve aussi dans tout le tube digestif : duodénum, jéjunum, iléon et côlon, mais en fréquence décroissante (Kojima et al 2005). Il existe deux types de cellules à ghréline : les cellules fermées et les cellules ouvertes. Les cellules ouvertes sont en contact avec la lumière digestive ; les cellules fermées n'ont pas de contact avec la lumière digestive, mais uniquement avec la vascularisation de la lamina propria. On ne trouve que des cellules fermées au niveau de l'estomac. On trouve les deux types de cellules dans le reste du tube digestif, la proportion de cellules fermées augmentent du côlon vers le duodénum, suggérant un rôle à la fois endocrine et exocrine de ces cellules (Hosoda et al 2006).

Des études ont montré que l'acyl- et/ou la désacyl-ghréline induisait l'adipogenèse dans la moelle osseuse, l'atrophie altérée des muscles squelettiques après le jeûne, l'augmentation de l'apport en glucose dans les myoblastes, la mitogenèse dans les ostéoblastes et l'augmentation de la glucogenèse dans le foie (Gauna et al 2005, Costa et al 2011, Porporato et al 2013, Callaghan et Furness 2014, Gershon et Vale 2014, Reano et al Stievenard 2016).

#### **4.1 Effet sur la prise alimentaire :**

Dans le contexte de la régulation de la prise alimentaire (cf plus haut, I), la ghréline est un peptide orexigène et un régulateur à long terme de l'homéostasie énergétique par deux actions majeures et complémentaires : en stimulant l'appétit au niveau hypothalamique et en stimulant l'adipogenèse, tant chez les rongeurs (Tschop et al 2000) que chez l'Homme (Wren et al 2001). La ghréline, par son action centrale et périphérique, est une hormone qui favorise un bilan énergétique positif. Elle est, à l'heure actuelle la seule hormone orexigène connue du tractus gastro-intestinal (Neary et Batterham 2009).

La concentration plasmatique de ghréline augmente rapidement avant chaque repas (3-5 minutes avant le début de la prise alimentaire) et diminue tout aussi rapidement dès l'ingestion d'aliments (effet à court terme), ce qui a permis de suggérer que la ghréline joue un rôle physiologique dans la sensation de faim et l'initiation du repas (Cummings 2006). Même s'il est admis que la sécrétion de la ghréline par l'estomac peu avant le repas déclenche la faim et provoque la prise de la nourriture, cette augmentation pourrait se produire en anticipation des repas pour réguler des processus associés à l'initiation des repas. La concentration basale de ghréline plasmatique est inversement corrélée à l'importance des réserves énergétiques, elle est plus faible chez l'obèse et plus élevée chez l'anorexique que chez le sujet sain. Elle augmente avec un régime et diminue avec une prise de poids (effet à long terme) (ATounian et al 2005).

Au niveau central, la ghréline est un régulateur des neurones hypothalamiques orexigènes au sein du noyau arqué (cf I ; figure 3).

Le délai très court nécessaire à l'induction du comportement alimentaire (3 à 5 mn) par la ghréline laisse supposer que cet effet ne dépend pas de l'augmentation de GH induite par le peptide, puisque cette dernière n'est observée qu'après cinq minutes. Cela est confirmé par le fait que la ghréline stimule la prise alimentaire chez des animaux déficients en GH (rats Dwarf ou souris Lit/lit) de façon comparable aux souches sauvages (Peroni et al 2012, Lugilde et al 2022). Toutefois, une étude récente a mis en évidence que les effets orexigènes de la ghréline sont absents chez des souris qui n'expriment plus le GHS-R dans les cellules à GH de l'hypophyse (Gupta et al 2021).

La ghréline agit également sur des centres non-hypothalamiques du cerveau, qui sont impliqués dans la régulation de la prise alimentaire : l'aire tegmentale ventrale (VTA) activant le système de récompense, l'hippocampe siège de l'apprentissage et de la mémoire, et le noyau central de l'amygdale contrôlant l'excitation émotionnelle.

#### **4.2 Effets de la ghréline sur la sécrétion de GH**

La ghréline a été initialement découverte comme stimulatrice de 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-secrétagogues 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 neurohormones qui agissent directement au niveau de l'hypophyse de façons opposées : 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 puis qu'il disparaît après une immunisation passive avec un antisérum 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 perfusion (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 pré-synaptique GABA-ergique 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).

Chez les rongeurs, 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). D'autres études montrent que la ghréline est un régulateur de l'amplitude des pics de GH chez la souris (Hassouna et al 2014). Chez l'Homme, une relation claire a été observée entre sécrétion de ghréline et sécrétion de GH chez des sujets recevant des repas standardisés (Ralph et al 2008), mais cette relation est abolie à la suite d'un jeûne. D'autre part il a été montré que la signalisation GHS-R1a joue un rôle plus critique dans la régulation de la

sécrétion pulsatile de GH pendant l'adolescence chez les mâles et à l'âge adulte chez les femmes (Labarthe et al 2021).

#### **4.3 Effets sur la prolifération cellulaire**

La ghréline active la sécrétion de l'hormone de croissance, la libération d'acide gastrique, l'appétit et la sécrétion d'insuline. Elle est également décrite comme étant liée à la progression du cancer et en particulier des métastases et prolifération (Tsung-Chieh Lin et al 2017).

Cet effet est controversé. Par exemple la ghréline favorise le cancer gastrique (Tian C et al 2013) et le cancer du colon (Talat Waseem et al 2008, Lien GS et al 2016,) ; elle favorise la prolifération cellulaire et le caractère invasif de l'adénocarcinome pancréatique (Duxbury et al 2003) ; un variant de la ghréline aggrave le cancer du sein (Manuel et al 2011). Une co-expression du GHS-R et de la ghréline dans les cellules cancéreuses de la prostate a été détectée (Jeffery et al 2002). Plusieurs rapports ont à l'inverse noté que la ghréline peut inhiber la prolifération des cellules cancéreuses, dans le cancer de l'ovaire (à partir de la phase G1 ; Xu Y et al., 2013), le cancer de la thyroïde, le cancer de la prostate, le cancer du sein et le carcinome pulmonaire à petites cellules (Volante et al 2003, Cassoni et al., 2006, Diaz-Lezama et al 2010).

## **5. Les mimétiques synthétiques de la ghréline**

Il existe plusieurs mimétiques de la ghréline qui ont des effets sélectifs sur la prise alimentaire et/ou la sécrétion de GH.

Le BIM-28131 a été décrit comme un bon stimulateur de la sécrétion de GH, et encore plus actif que la ghréline pour stimuler la prise alimentaire et la prise de poids. Il stimule l'expression de cFos de la même manière que la ghréline dans le NTS et l'AP (Hassouna et al 2013). Par contre, le BIM-28163 inhibe la sécrétion de GH et stimule la prise de nourriture, la prise de poids et l'expression de cFos ; il agit donc également par l'intermédiaire d'un autre récepteur (Hassouna et al 2013).

L'adénosine, un agoniste partiel de la ghréline, ne stimule pas la sécrétion de GH (Tullin et al 2000). La cortistatin, ligand naturel du GHS-R1a, atténue les effets de la ghréline (Broglio et al 2002). EP 51389 et TH 2306.34 sont des agonistes synthétiques de la ghréline qui stimulent la sécrétion de GH (Bluet-Pajot et al 2005).

Une nouvelle série d'analogues du sécrétagogue de l'hormone de croissance (GHS) basée sur la structure 1,2,4-triazole a été synthétisée et évaluée pour leur liaison *in vitro* et leur capacité à stimuler la libération intracellulaire de calcium via le récepteur cloné de la ghréline GHSR-1a. Parmi ceux-ci, l'hexapeptide Hexarelin (His-D-2Me-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>), le JMV-2894 (C<sub>37</sub>H<sub>41</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>) et le JMV-2851 ont entraîné une stimulation très active de la sécrétion de GH et l'augmentation significative de la prise alimentaire. Des rats traités à la cisplatine, composant anticancéreux qui mime la cachexie et provoque une perte de poids, ont repris du poids après traitement à l'hexareline, ou le JMV-2894, ou le JMV-2851 (Bresciani et al 2017). Le JMV-1843 est un tripeptide et, comme la ghréline, c'est un « super-agoniste » sur la voie de l'inositol-triphosphate et il joue un rôle très important dans la prise alimentaire dans le modèle de la cachexie. Il est également puissant et sélectif pour stimuler la libération de GH et est oralement actif. Il a été récemment commercialisé pour le diagnostic du déficit en hormone de croissance chez l'adulte sous le nom commercial Macrilen<sup>TM</sup>. *In vivo* le JMV-1843 administré par voie sous-cutanée (s.c) chez le rat stimule la libération de GH dose-dépendante dans la même mesure que l'hexaréline (Martinez et Faerhertz 2020).

Le JMV-3018, le JMV-2659 et le JMV-3002 possèdent un effet agoniste partiel sur la voie phosphate inositol (Kadmi et al 2015).

Les ligands JMV-2659, JMV-3002 et le JMV-2810 sont des agonistes partiels qui suppriment la prise alimentaire induite par la ghréline (Salomé 2009).

**Tableau 1.** Différents mimétiques de la ghréline et leurs fonctions

<b>Mimétiques</b>	<b>Type d'activité sur le GHS-R</b>	<b>Fonction</b>	
<b>Adénosine</b>	<b>Agoniste partiel</b>	<b>Ne stimule pas la sécrétion de GH</b>	
<b>Cortistatine</b>	<b>Ligand naturel du GHSR1a</b>	<b>Atténue les effets de la ghréline sur la prise alimentaire et sur la GH</b>	
<b>EP-51389, TH-2306.34</b>	<b>Agoniste</b>	<b>Stimule la sécrétion de GH</b>	
<b>BIM-28131</b>	/	<b>Augmente la prise de poids</b>	
<b>TZP-101</b>	/	<b>stimule la vidange gastrique</b>	
<b>BIM-28163</b>	/	<b>Inhibe l'effet de la ghréline sur la GH mais augmente la prise de poids</b>	
<b>Hexaréline</b>	<b>Agoniste</b>	<b>Stimule la libération de GH, hormone de croissance</b>	
<b>JMV-2894, JMV-2851</b>	/	<b>Augmentation de la prise alimentaire et stimule la sécrétion de GH</b>	
<b>JMV-1843</b>	<b>Super agoniste de la voie IP3</b>	<b>Augmente la prise alimentaire</b>	<b>Prise alimentaire</b>
<b>JMC-3018, JMV-2659, JMV-3002</b>	<b>Agoniste partiel sur la voie IP3</b>	<b>Stimule la libération de GH</b>	<b>GH</b>
<b>JMV-2659, JMV-3002, JMV-2810</b>	<b>Agoniste partiel</b>	<b>Supprime la prise alimentaire</b>	<b>Prise alimentaire</b>

### **III- Les cellules-souches neurales des Mammifères adultes**

La découverte des cellules-souches neurales, suivant celle de la neurogenèse adulte (ou « secondaire »), a constitué une révolution conceptuelle dans le domaine des Neurosciences, qui postulait depuis Ramon y Cajal que les neurones étaient générés exclusivement au cours du développement embryonnaire.

#### **1. Mise en évidence et définitions**

La neurogenèse adulte a été mise en évidence dès les années 1960, chez des rongeurs à différents âges post-nataux, par l'administration *in vivo* du précurseur d'ADN thymidine tritiée suivie d'une période de survie de quelques jours ou semaines. Dans cette approche, les cellules marquées post-mortem par détection radioautographique sur coupes tissulaires correspondent obligatoirement à la descendance de cellules qui se trouvaient en cours de division au moment de l'injection. Parmi les cellules marquées, certaines étaient identifiables comme corps cellulaires de neurones différenciés par la coloration de Nissl (Altman 1962). Deux foyers de neurogenèse adulte ont été identifiés ainsi : le gyrus denté de l'hippocampe où la prolifération neurogène est locale (Altman et Das 1965) et le bulbe olfactif, dans lequel les nouveaux neurones proviennent par migration à partir de cellules prolifératives situées dans la zone sous-ventriculaire au niveau du striatum (Altman 1969). De plus, puisque les neurones sont exclusivement post-mitotiques et incapables de se diviser (en plus d'un siècle, aucune figure de mitose n'a jamais été rapportée dans des neurones différenciés), la découverte d'une neurogenèse à l'âge adulte suggérait l'existence de cellules-souches neurales prolifératives. Mais il a fallu attendre 30 ans de plus pour la mise en évidence formelle de cellules-souches neurales dans le cerveau de mammifères adultes, par culture primaire à partir de zone sous-ventriculaire microdisséquée de souris adulte, en présence des mitogènes Epithelial Growth Factor (EGF) et basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) dans un milieu nutritif dépourvu de sérum (Reynolds et Weiss 1992). Dans ces conditions, la plupart des cellules dissociées meurent mais il apparaît des massifs sphériques qui grossissent au fil des jours (signe de prolifération). Au bout de 8-10 jours, quand ces sphères atteignent un diamètre de 80-100 µm, sous peine de voir périr la culture il faut faire un « passage » : dissociation des sphères, resuspension et ré-ensemencement dans le même milieu de culture frais; de nouvelles sphères, identiques à celles de la génération précédente, réapparaissent (signe d'autorenouvellement des cellules prolifératives ; Reynolds et Rietze 2005). Si l'on transfère ces sphères dans un milieu dépourvu des mitogènes EGF et bFGF, dans les jours suivants les sphères s'étalent et leurs

cellules se différencient morphologiquement ; par immunocytochimie de marqueurs phénotypiques, il est alors possible d'y mettre en évidence les 3 types cellulaires neuraux : neurones, astrocytes, oligodendrocytes (en proportions respectives 25%, 70%, 5%), signe de multipotentialité neurale ; ces sphères ont donc été désignées « neurosphères » (Reynolds et Weiss 1992).

Le « test des neurosphères » (neurosphere assay) *ex-vivo* reste le critère absolu de mise en évidence de cellules-souches neurales dans un explant de tissu nerveux (Louis et al 2013). L'application du test des neurosphères à différentes régions microdisséquées du système nerveux central de Souris adulte a permis de démontrer l'existence de cellules-souches neurales dans l'hypothalamus, le plancher du ventricule IV, la moelle épinière thoracique et lombaire (Weiss et al 1996). Dans la moelle épinière, les cellules-souches neurales ont une prolifération très active, autant que dans la SVZ (Zone sous ventriculaire) ; mais *in vivo* elles ne donnent pas lieu à neurogenèse ; leur descendance est exclusivement gliale. Si des neurosphères dérivées d'explants de moelle épinière de souris adulte sont transplantées dans l'hippocampe d'une autre souris adulte, elles engendrent des neurones de type hippocampique dans ce site ectopique (Shihabuddin et al 2000). Cette expérience pionnière démontrait que l'expression du potentiel neurogène des cellules-souches neurales est essentiellement déterminé par leur microenvironnement tissulaire, ou en d'autres termes qu'il est dû à un contrôle exogène et pas à une propriété intrinsèque (pour revue, voir Moysé et al 2008).

L'utilisation combinée de l'incorporation *in vivo* de BrdU (un précurseur synthétique de biosynthèse d'ADN, ayant les mêmes propriétés que la thymidine tritiée mais détectable par immunohistochimie) et du test *in vitro* des neurosphères a permis dans les deux dernières décennies de découvrir quelques autres sous-populations de cellules-souches neurales, très circonscrites anatomiquement, avec ou sans neurogenèse (pour revue, Lin et Iacovitti 2015).

Une caractéristique majeure des cellules-souches neurales est leur grande résistance à la tumorigénicité. Il a été démontré qu'une culture primaire de cellules-souches neurales de SVZ peut être maintenue pendant plus de 70 générations sans aucune altération de leur taux de prolifération et d'autorenouvellement, sans changement de leur multipotentialité, sans sénescence répllicative et sans signe de tumorigenèse (Feroni et al 2007). L'absence de relation entre les cellules-souches tumorales de gliomes et les cellules-souches neurales saines est largement confirmée en oncologie humaine (Corell et al 2022). Ces propriétés présentent un contraste frappant avec les cellules-souches de certains autres tissus comme la prostate, dont leur évolu-

tion directe en cellules-souches cancéreuses est bien établie, en clinique humaine et chez les modèles animaux (cf IV).

Sur le plan physiologique, les rôles majeurs des cellules-souches neurales et de la neurogenèse adulte concernent la neuroplasticité fonctionnelle et les adaptations nerveuses à l'environnement. La neurogenèse adulte de l'hippocampe est fortement impliquée dans la plasticité liée aux fonctions d'apprentissage et de mémoire (Toda et al 2019).

## **2. La niche neurogénique du complexe vagal**

Une nouvelle niche de cellules-souches neurales avec neurogenèse locale a été mise en évidence dans le complexe vagal chez les Rongeurs adultes, selon une démarche expérimentale devenue classique.

L'existence d'une neurogenèse adulte dans le complexe vagal a été démontrée par l'incorporation de BrdU, administré à l'âge adulte *in vivo* dans des neurones (identifiés par immunohistofluorescence de NeuN, HuC/D, DCX) dans le NTS surtout (centre du réflexe de satiété, cf I) mais aussi dans le noyau moteur dorsal du nerf X et l'area postrema, chez le rat (Bauer et al 2005, Chigr et al 2009) et chez la souris (Trevaskis et al 2010, Liberini et al 2016).

La présence de cellules-souches neurales a été formellement démontrée par application du « test des neurosphères » sur explants microdisséqués de complexe vagal de rat adulte (Charrier et al 2006, Chigr et al 2009) puis sur explants d'area postrema isolée de souris adulte (Bennett et al 2009). Dans les deux cas, la culture primaire de la suspension cellulaire obtenue par dissociation enzymatique et mécanique de ces deux types d'explants, en présence d'EGF, de bFGF et de supplément B27 mais sans sérum bovin fœtal, a conduit à la genèse de sphères autoreouvelables contenant les trois types cellulaires du tissu nerveux. A partir d'area postrema isolée, l'efficacité de genèse de neurosphères était plus importante qu'à partir de complexe vagal entier, et du même ordre que celle de la SVZ de souris adulte (Bennett et al 2009). Une niche gliale, similaire à celle de la SVZ et de l'hippocampe, a été identifiée comme une dense population d'astrocytes qui coexpriment GFAP, nestine, vimentine et qui présentent une disposition radiale par rapport à la surface du ventricule IV (Pecchi et al 2007). Ces auteurs ont montré que des mitogènes de cellules-souches neurales EGF et bFGF, infusés par voie intracérébroventriculaire *in vivo* dans le ventricule IV de rats adultes pendant 3 jours, stimulaient l'incorporation de BrdU spécifiquement dans le complexe vagal et que les cellules néoformées migraient le long des astrocytes radiaux dans le NTS (Pecchi et al 2007).

Ces données suggèrent que la neurogenèse adulte du complexe vagal dérive après une courte migration des cellules-souches neurales de l'area postrema (Moyses et al 2006).

La greffe de neurosphères primaires de SVZ pré-amplifiées et marquées *in vitro* dans le NTS chez le rat adulte, a entraîné l'apparition de nouveaux neurones marqués GFP Green Fluorescent Protein, ce qui démontrait que le tissu du complexe vagal est permissif pour la neurogenèse (contrairement à la plupart des autres structures du système nerveux central) (Mitome et al 2009).

Sur le plan physiologique, la prolifération des cellules-souches neurales et la neurogenèse du complexe vagal de rat adulte *in vivo* sont stimulées par une lésion vagale (la section du nerf vague cervical ; Bauer et al 2005, Charrier et al 2006) et inhibées par un stress chronique, tout comme la neurogenèse de l'hippocampe (Chigur et al 2009). D'autre part, la prolifération neurogène de l'area postrema *in vivo* est stimulée par l'hormone de satiété amyline chez le rat adulte (Trevaskis et al 2010, Liberini et al 2016), suggérant une implication de la neurogenèse du complexe vagal dans la régulation de la prise alimentaire par les hormones périphériques.

### **3. Les effets de la ghréline sur les cellules-souches neurales**

Des actions significatives de la ghréline, globalement stimulatrices, ont été documentées dans les deux niches neurogéniques classiques : SVZ et surtout hippocampe.

La neurogenèse de la SVZ *in vivo* est plus faible chez la souris GHSR-KO que dans les témoins sauvages de même âge, indiquant a contrario que la signalisation ghréline endogène *in vivo* est stimulatrice sur la neurogenèse du système SVZ-bulbe olfactif (Li et al 2014). *In vitro*, la ghréline stimule la prolifération neurogène des cellules-souches neurales de SVZ de souris sauvage adulte dans le test des neurosphères (Li et al 2014).

Dans l'hippocampe, *in vitro*, la ghréline acylée stimule significativement la prolifération des cellules-souches neurales de l'hippocampe de souris adulte (Li et al 2013a, Chung et al 2013). La stimulation proliférative des cellules-souches neurales de l'hippocampe a été reliée à une activation directe de l'expression des gènes de la machinerie de contrôle du cycle cellulaire dans ces cellules (Chung et Park 2016) par l'intermédiaire de plusieurs voies de signalisation intracellulaires : ERK1/2, PI3/Akt, mTOR, Jak2/STAT3 (Chung et al 2013). Le recrutement de ces mécanismes et l'induction proliférative par la ghréline sont bloquées par un antagoniste spécifique du récepteur GhsR (Chung et al 2013, Chung et Park 2016).

*In vivo*, la ghréline acylée stimule la neurogenèse hippocampique marquée par incorporation de BrdU chez la souris adulte (Moon et al 2009) corrélativement avec une amélioration signi-

ficative de comportements dépendants de l'hippocampe (Li et al 2013b, Kent et al 2015). Chez le rat invalidé pour le récepteur de ghréline (GhsR KO), la diminution de neurogenèse hippocampique et de mémoire dépendante de l'hippocampe en fonction de l'âge est accélérée par rapport à la souche sauvage (Cahill et al 2014). La neurogenèse hippocampique abaissée chez la souris-modèle d'Alzheimer 5XFAD par rapport à la souche sauvage est significativement restaurée par traitement à la ghréline (Moon et al 2014). Le régime nutritionnel de restriction calorique chez les rongeurs adultes stimule à la fois la neurogenèse hippocampique et la concentration plasmatique de ghréline (Kim et al 2015). L'invalidation génétique du récepteur de ghréline (souris GhsR  $-/-$ ) suffit à bloquer la stimulation de la neurogenèse adulte de l'hippocampe et de la mémoire hippocampique par la restriction calorique par rapport aux souris adultes sauvages (Kim et al 2015, Hornsby et al 2016). La modulation de la neurogenèse hippocampique par la ghréline est donc impliquée causalement dans l'effet bénéfique de la restriction calorique sur la cognition (Buntwal et al 2019).

La forme non-acylée de la ghréline, *in vivo* chez la souris, bloque la neurogenèse hippocampique (Hornsby et al 2020).

La littérature a donc documenté que la ghréline stimule la prolifération neurogène de la SVZ et de l'hippocampe par action directe sur les cellules-souches neurales via le récepteur GHS-R. Mon premier objectif de thèse a consisté à caractériser l'effet de la ghréline sur les cellules-souches neurales du CVD *in vitro*.

## **IV- Pathologies liées aux dérégulations de l'équilibre énergétique**

### **1. L'obésité**

L'obésité est une maladie chronique, définie comme une inflation de la masse grasse entraînant des conséquences sur le bien-être physique, la santé somatique, psychologique et sociale. Initialement, la prise de poids est liée à des facteurs comportementaux et environnementaux, dont l'impact dépend des facteurs de prédisposition biologiques (génétiques). L'évolution de la maladie est marquée par le développement d'une pathologie inflammatoire d'organe qui concerne les adipocytes et les autres constituants du tissu adipeux. Dans la majorité des cas, l'inflation adipeuse est due à une incapacité à faire face à un excès d'apport alimentaire et à une insuffisance des dépenses énergétiques.

Ces altérations entraînent une variété de complications cliniques et une résistance progressive aux effets des régimes. Le traitement doit être adapté au stade évolutif de la maladie et aux complications dominantes. (Basdevant et al 2006).

L'obésité est associée et contribue à une durée de vie raccourcie, au diabète sucré de type 2, aux maladies cardiovasculaires, à certains cancers, aux maladies rénales, à l'apnée obstructive du sommeil, à la goutte, à l'arthrose et aux maladies hépatobiliaires, entre autres. (Bray et al 2018)

## **2. L'anorexie**

L'anorexie mentale (AM) est un trouble du comportement alimentaire caractérisé par une restriction alimentaire sévère, une perte de poids importante et, dans 80% des cas, une activité physique excessive (Davis et al 1997). L'AM touche essentiellement les jeunes femmes de moins de 25 ans mais également les hommes dans 1 cas sur 10 (Lucas et al 1991, Nagl et al 2016).

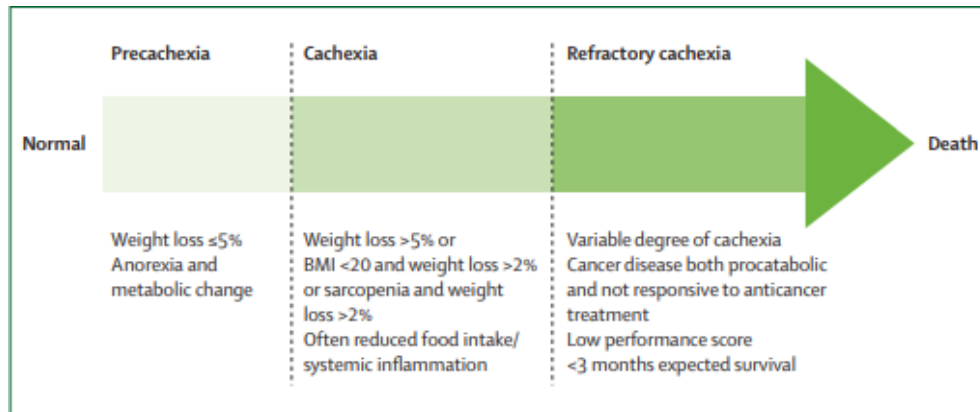
Dans les situations de dénutrition chronique, comme dans le cas de l'anorexie mentale, les niveaux de ghréline sont significativement augmentés chez les patients par rapport aux sujets sains non dénutris (Tolle et al 2003, Germain et al 2009, 2010). Malgré une élévation substantielle des taux plasmatiques 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).

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).

## **3. La cachexie cancéreuse**

La cachexie est un trouble métabolique en progression qui entraîne une réduction de la fonction physique, une perte de poids et de muscle importante, une tolérance réduite à la thérapie anticancéreuse, et à une réduction de la survie. C'est une complication dévastatrice du cancer et une cause importante de morbidité et de mortalité et peut avoir un effet important sur la qualité de vie et l'estime de soi (Khatib et al 2018, Torres-Fuentes 2018).

La cachexie du cancer a été classée en stades de pré-cachexie, de cachexie et de cachexie réfractaire (Figure 10).



**Figure 10.** Stades de la cachexie cancéreuse (Fearon et al 2011).

La cachexie représente un spectre à travers lequel les patients n'évoluent pas tous de la même façon. À l'heure actuelle, il n'existe pas de biomarqueurs confirmés pour identifier les patients précachexiques qui sont susceptibles de progresser vers la cachexie réfractaire.

La cachexie réfractaire est définie essentiellement sur la base des caractéristiques cliniques et des circonstances du patient.

BMI = *Body mass indice* (indice de masse corporelle)

L'inflammation chronique est également un facteur important de la cachexie, car elle affecte la fonction de plusieurs tissus tels que le muscle squelettique, la graisse, le cerveau et le foie (Argiles et al 2012). Parallèlement à l'activité déficiente des facteurs anabolisants, la production de facteurs favorisant le catabolisme est augmentée dans les modèles de souris cachectiques et chez les patients, à savoir : l'angiotensine II, IL-1, IL-6, myostatine, activine A, IFN- $\gamma$  et TNF $\alpha$  (Figure 11).

Il a été rapporté qu'au cours de la cachexie, les patients atteints de cancer et les modèles de souris subissent une diminution de leur taux de cholestérol, des niveaux circulants du facteur anabolisant insuline-like growth (IGF-1) et le développement d'une résistance à l'insuline (Garcia et al 2005, Costelli et al 2006, Asp et al 2010).

L'ablation de la tumeur améliore la tolérance au glucose suggérant que les cytokines sont sécrétées en partie par la tumeur elle-même. Au niveau musculaire, le taux de synthèse protéique est réduit et la machinerie catabolique est activée. Il en résulte une augmentation de la consommation d'énergie, une balance azotée négative, une utilisation accrue de glutamine et des perturbations du métabolisme des acides aminés (Fearon et al 2011).

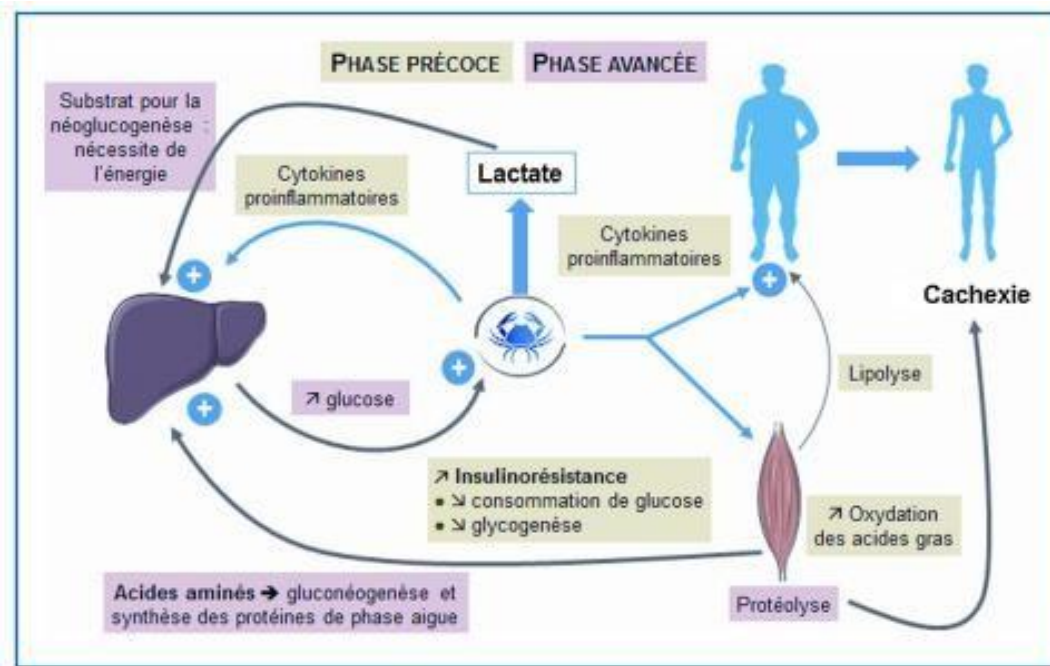


Figure 11. Rôle de la signalisation inflammatoire dans l'évolution vers la cachexie (Klement et Kämmerer, 2011).

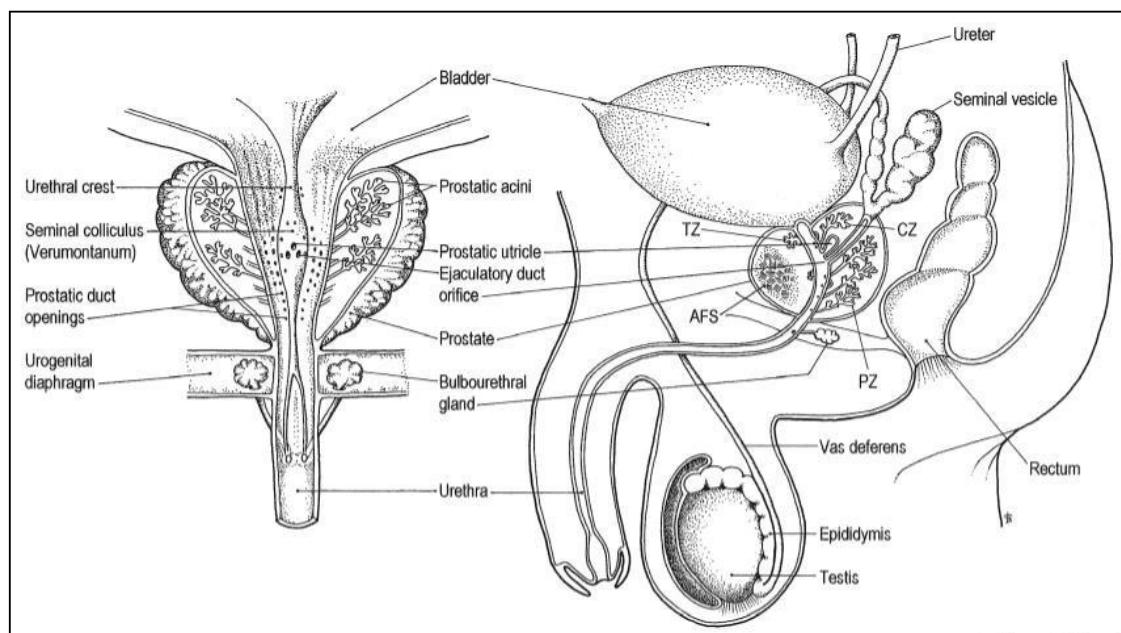
## V- Ghréline et cancer de la prostate

### 1. Description anatomique et histologique de la prostate

#### 1.1. Chez l'Homme

La prostate, chez l'Homme, est une glande de l'appareil urogénital masculin, située entre le plancher pelvien et la cavité péritonéale, soit au carrefour des voies urinaires et des voies spermatiques (Figure 12). La prostate est entourée d'une pseudo-capsule composée d'une couche interne musculaire lisse et d'une couche externe de collagène (Seisena et al 2012). Sa forme est souvent comparée à une châtaigne. Elle mesure environ 30 mm de hauteur, 20 mm de largeur et 25 mm d'épaisseur en moyenne et pèse entre 15 et 25 grammes à l'âge adulte.

Très petite à la naissance, la prostate augmente de volume au moment de la puberté sous l'action de l'augmentation des niveaux d'androgènes, et peut atteindre une moyenne de 20 g à l'âge adulte. Elle augmente avec l'âge pour atteindre des volumes de 40 à 80 grammes après 60 ans (Hayward et Cunha 2000, Verze et al 2016). La prostate est richement vascularisée et le réseau lymphatique et très riche (Marolla et al 2006).



**Figure 12.** Représentation schématique des coupes frontales et sagittales de l'appareil urogénital mâle indiquant la position anatomique de la prostate adulte. Les zones prostatiques décrites par McNeal (1983) sont indiquées : zone centrale (CZ), zone périphérique (PZ), stroma fibromusculaire antérieur (AFS) et zone de transition (TZ) (Timms 2008).

Le modèle anatomique de la prostate actuellement adopté est celui proposé par McNeal en 1981. Ainsi, trois zones anatomiques ont été définies (Figure 13a) :

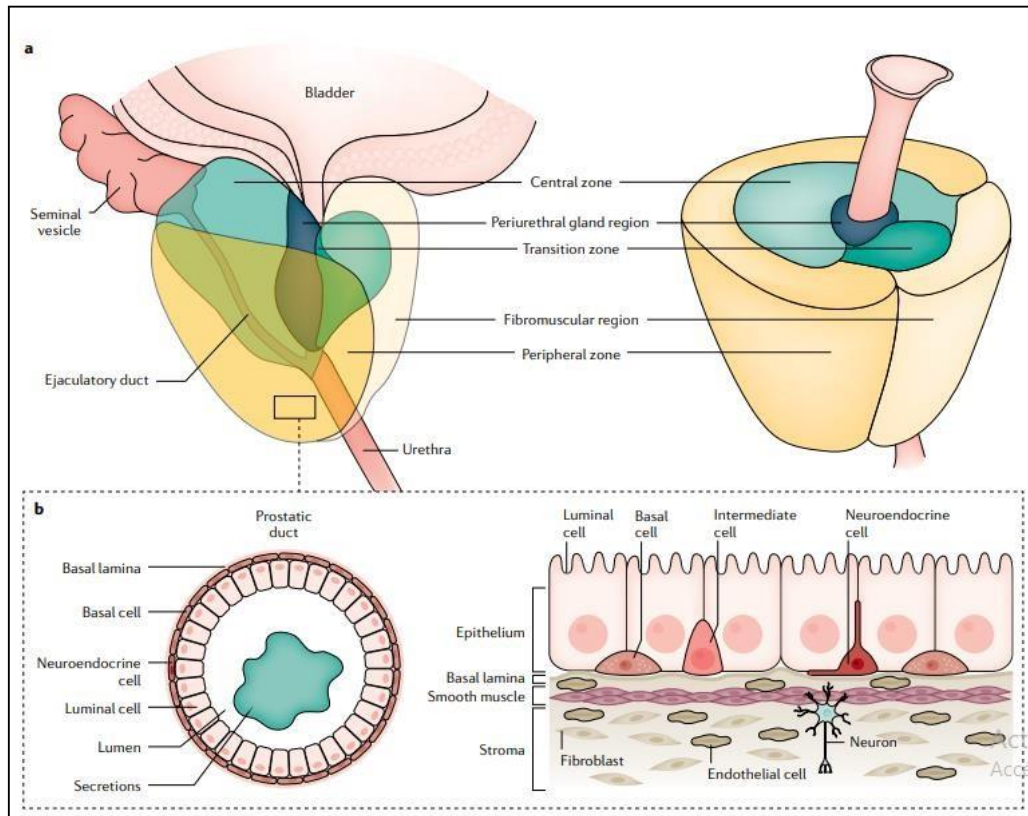
**1- La zone périphérique** : constitue plus de 70% de la prostate glandulaire. La très grande majorité (plus de 85%) des carcinomes se développent dans cette zone.

**2- La zone centrale** : constitue 25% de la prostate glandulaire. Ses canaux se trouvent près des orifices du conduit éjaculatoire. Elle est le siège de 5% des cancers.

**3- La zone de transition** : se trouve entre les deux précédentes et contient les glandes dites mucosales (5% de la prostate glandulaire). Elle est le site exclusif de l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP), et le siège de 10% des cancers prostatiques (CaP).

La prostate est formée de 30 à 40 lobules. Chaque lobule est composé d'alvéoles (ou acinus) glandulaires entourés d'un stroma abondant. L'épithélium glandulaire qui compose ces acini est formé de 2 couches cellulaires (Figure 13b) :

❖ **La couche épithéliale luminale** : les cellules luminales sont abondantes et différenciées. Elles sont androgéno-dépendantes (entrent en apoptose lors d'une suppression androgénique) et synthétisent les protéines sécrétoires prostatiques.



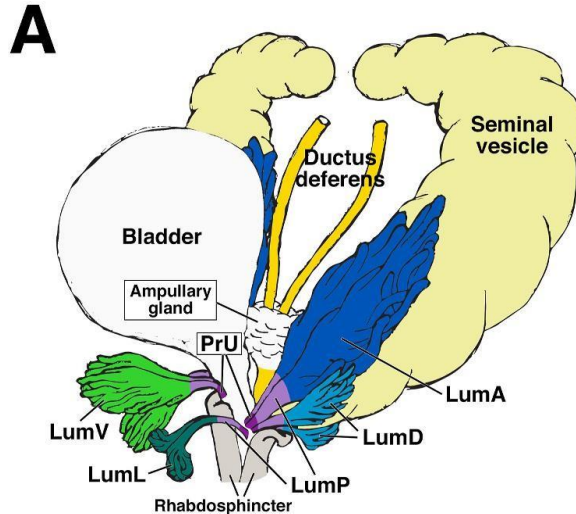
**Figure 13.** Anatomie et structure histologique de la prostate humaine. **a)** La prostate est divisée en cinq régions anatomiques : la zone centrale, la région périurétrale, la zone de transition, la zone périphérique et la région fibromusculaire (ou stroma). La plupart des tumeurs prennent naissance dans la zone périphérique. **b)** Chaque région comprend des canaux et des acini dispersés dans le stroma, qui contient divers types de cellules, principalement des cellules du muscle lisse, des cellules neuroendocrines mais aussi des fibroblastes (Rebello et al 2016).

- ❖ La couche épithéliale basale : est située en périphérie. Elle est composée de cellules souches et de cellules en cours de différenciation donnant naissance à plusieurs sous populations de cellules progénitrices. Elles sont caractérisées par une faible expression des androgènes et ne produisent pas l'antigène spécifique prostatique (PSA). Quelques cellules neuroendocrines, androgéno-indépendantes, sont également dispersées dans la membrane basale ; elles interviennent dans la régulation de la croissance et de l'activité sécrétrice des cellules luminales.

L'interaction stroma-épithélium joue un rôle important dans le développement physiologique de la prostate mais également dans celui des pathologies prostatiques : l'hypertrophie bénigne de la prostate et le cancer (Cunha 1994, Schalken et Leenders 2003, Ishii et al 2018).

## 1.2. Chez les Rongeurs

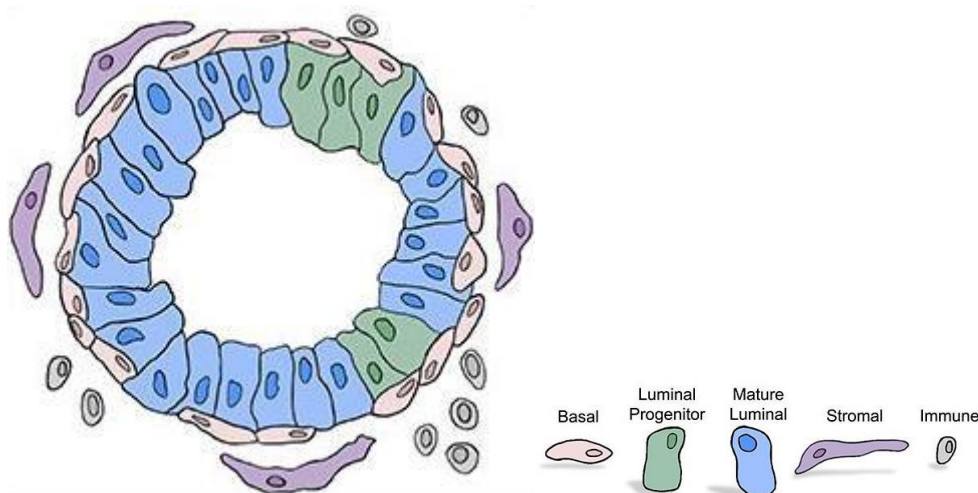
La prostate est localisée autour de la face dorsale de la vessie et de l'uro-spermiducte. Elle comporte plusieurs lobes (Figure 13).



**Figure 14.** Structure anatomique de la prostate (Crowley et Shen 2022). *LumA*, *LumD*, *LumL*, *LumP*, *LumV* : les différents lobes de la prostate.

Histologiquement, la glande est constituée d'acini épithéliaux (éléments exocrines creux en cul-de-sac) se prolongeant en canaux sécréteurs, englobés dans un compartiment stromal fibromusculaire (Ittman 2018). Le compartiment épithélial est constitué de deux assises cellulaires concentriques : la couche luminale, en contact avec la lumière interne de l'acinus, et la couche basale périphérique ; des cellules endocrines sont dispersées dans l'épithélium (Figure 14).

Les cellules luminales sont les cellules exocrines différenciées, de forme colonnaire, avec leur noyau excentré au pôle basal ; elles expriment l'antigène spécifique de prostate (PSA), une batterie spécifique de cytokératines, et le récepteur aux androgènes (Ittman 2018). Les cellules basales, adjacentes à la lame basale et aplaties, expriment spécifiquement p63 et présentent une activité proliférative.



**Figure 15.** Histo-cytologie de la prostate de rongeur adulte mâle (Freeland et al 2021).

### 1.3. Les cellules-souches de l'épithélium prostatique

L'existence de cellules-souches dans l'épithélium de prostate a été démontrée suite à la privation d'androgènes (par castration expérimentale par exemple) qui entraîne dans les jours suivants une perte massive de cellules lumineuses par apoptose (Ittman et al 2018). La supplémentation d'androgènes permet la restauration de l'épithélium ; ce cycle peut se répéter 15 fois chez les rongeurs mâles adultes, ce qui indique l'existence de cellules souches/progénitrices indépendantes des androgènes (Evans et Chandler 1987). La couche luminale et la couche basale des acini épithéliaux sont renouvelables grâce à deux sous-populations respectives de progéniteurs (Crowell et al 2021). Il a été démontré formellement en culture primaire que les cellules basales vérifient les critères de cellule-souche, notamment la multipotentialité (capacité à engendrer tous les types cellulaires du tissu-hôte) et l'autorenouvellement (Pignon et al 2013).

Le milieu de culture primaire des cellules-souches de prostate de souris a été mis au point de longue date (Xin et al 2007). Nommé « prostate epithelial cell growth medium » (PrEGM), il contient de nombreux additifs, dont les hormones hydrocortisone, insuline, adrénaline, T3-thyroïdienne, et les facteurs de croissance EGF et acide rétinoïque, et divers suppléments nutritifs (Xin et al 2007). Plus récemment, un mode de culture tridimensionnel en « **prostasphères** » a été mis au point en ajoutant du bFGF, ce qui facilite l'analyse de l'autorenouvellement des cellules-souches – comme dans le cas des cellules-souches neurales (Lukacs et al 2010, Huang et al 2015).

Les lignées dérivées de tumeurs de prostate humaines sont cultivables dans un milieu beaucoup plus simple, consistant en milieu minimum type RPMI (Roswell Park Memorial Institute) simplement supplémenté en sérum de bovin foetal (Kaighn et al 1978).

## **2. Rôle physiologique de la prostate**

La prostate est une glande exocrine, dont la principale fonction est de produire le liquide prostatique, qui représente environ 20% du liquide séminal, les 80% restants étant sécrétés par les vésicules séminales. Ce liquide contient plusieurs substances qui permettent au sperme de rester sous forme liquide en empêchant sa coagulation (Aumüller 1983) : i) l'acide citrique assurant la survie des spermatozoïdes à travers la production d'adénosine triphosphate (ATP); ii) Les enzymes protéolytiques qui dégradent les protéines de coagulation provenant des vésicules séminales ; iii) la phosphatase acide ; iv) la plasmine séminale qui agit comme antibiotique afin d'éviter toute infection du tractus urinaire male. Ses autres constituants sont majoritairement des protéines : le PSA, la phosphatase acide prostatique (PAP) et des molécules ionisées (citrate, zinc, polyamines, glycoprotéines) ce qui confère à la prostate un rôle important dans la liquéfaction du liquide séminal ainsi que la protection des spermatozoïdes contre de nombreux agents et facteurs cytotoxiques (Balk et Bublely 2003). La fonction de la prostate est régulée par la testostérone une hormone sexuelle masculine produite principalement dans les testicules. Dans la prostate adulte, les androgènes ont un effet à la fois sur les cellules épithéliales en les maintenant dans un état différencié et relativement quiescent et sur les cellules du stroma. Les androgènes sont donc des médiateurs majeurs des interactions paracrines entre cellules épithéliales et cellules stromales qui permettent le maintien de l'homéostasie prostatique (Ishii et al 2018).

Deux récepteurs aux stéroïdes sont impliqués dans le développement et le bon fonctionnement de la prostate : le récepteur aux androgènes (AR) et le récepteur aux œstrogènes (ER). Une surexpression de ces deux protéines est corrélée avec la présence d'un CaP (Gregory et al 2001).

### **3. Physiopathologie de la prostate**

#### **3.1. La prostatite**

C'est la maladie prostatique la plus fréquente chez l'homme de moins de 50 ans. Il s'agit d'une inflammation aigüe ou chronique de la prostate qui est fréquemment la conséquence d'une infection bactérienne urinaire. Elle se divise en quatre catégories : i) la prostatite bactérienne aigüe ; ii) la prostatite bactérienne chronique ; iii) le syndrome de la prostatite chronique caractérisée par une douleur pelvienne chronique ; iv) la prostatite inflammatoire asymptomatique. Cette pathologie très commune se soigne facilement par antibiothérapie (Franco et al 2018).

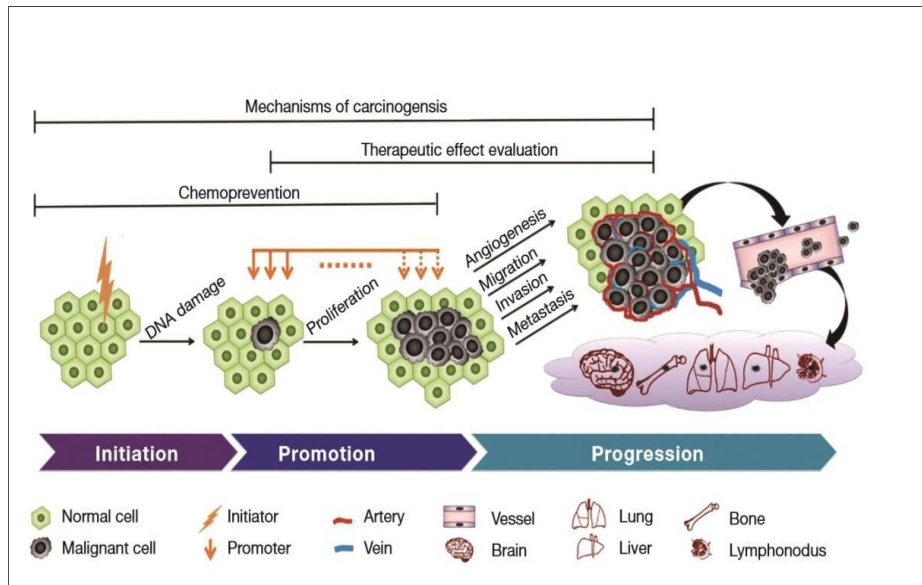
#### **3.2. L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP)**

L'HBP est une tumeur bénigne qui se développe aux dépens de la partie crâniale de la prostate ; cette pathologie concerne environ 50% des hommes entre 51 et 60 ans et 90% des hommes de plus de 80 ans. Dans l'HBP, la prolifération cellulaire entraîne une augmentation du volume péri-urétrale de la prostate et une augmentation du tonus musculaire lisse. Ceci risque d'étrangler l'urètre et de l'obstruer partiellement et par conséquent, provoquer des troubles urinaires et des douleurs chroniques. L'HBP n'augmente pas le risque de développer le CaP. Les deux maladies peuvent présenter des symptômes similaires, bien que la plupart du temps, le CaP ne présente aucun symptôme. Il est par ailleurs possible de présenter à la fois une HBP et un CaP (Simpson et al 1996). Les traitements possible sont, l'hormonothérapie, la phytothérapie ou la chirurgie (ablation d'une partie de la glande) (Langan 2019).

#### **3.3. Le cancer de la prostate**

La cancérogénèse est l'ensemble des phénomènes transformant une cellule normale en cellule cancéreuse résultant d'altérations de l'ADN cellulaire qui perturbent de façon permanente l'homéostasie tissulaire (Figure 16); la formation d'un cancer étant elle-même l'aboutissement d'événements résultant de la prolifération rapide et incontrôlée de cellules qui ne suivent plus le processus normal de mort cellulaire par apoptose, et deviennent immortelles (Liu et al 2015). La cancérogénèse est un processus complexe pouvant être divisé en trois phases distinctes :

- **L'initiation tumorale :** L'initiation est la première étape du développement d'un cancer. Les agents initiateurs sont des agents génotoxiques qui induisent une lésion définitive de l'ADN. De nombreux initiateurs sont spécifiques d'espèces ou de types de tissus particuliers entraînant des modifications irréversibles de l'ADN qui vont permettre à une cellule normale d'acquérir des propriétés qui l'amènent progressivement à une transformation en cellule tumorale initiée. Étant donné que l'initiation entraîne un changement génétique permanent, toute cellule fille issue de la division de la cellule mutée sera également porteuse de la mutation (Richmond et Su 2008).
- **La phase de promotion tumorale :** correspond à la prolifération et la multiplication anormale du clone des cellules initiées, contenant la mutation créée par l'initiateur (Trosko 2001). Contrairement aux initiateurs, les promoteurs ne se lient pas de manière covalente aux macromolécules ou à l'ADN à l'intérieur de la cellule, mais nombre d'entre eux se lient à des récepteurs sur la surface de la cellule afin d'intervenir au niveau des voies intracellulaires qui augmentent la prolifération cellulaire. La croissance tumorale est dose-dépendante avec un seuil et un effet maximal des promoteurs : de très faibles doses ne favorisent pas l'apparition de tumeurs et des doses extrêmement élevées n'augmentent pas le risque tumoral. Les promoteurs augmentent l'expansion clonale des cellules initiées et conduisent ultérieurement à la malignité (Klaunig et al 2000).
- **La phase de progression tumorale :** qui marque le passage irréversible des lésions précancéreuses à des lésions malignes, avec une prolifération cellulaire indépendante, une extension invasive de la tumeur et une capacité à métastaser. Les agents promoteurs n'induisent pas de lésions de l'ADN mais favorisent l'expression d'une lésion, préalablement induite par un agent initiateur. La progression est associée à des changements du caryotype : la plupart des tumeurs avancées présentent une aneuploïdie. Ce changement s'accompagne d'altérations biochimiques et morphologiques dues à l'instabilité génétique (Oliveira et al 2007). Un apport en énergie devient indispensable pour la survie de la tumeur. Elle élabore un réseau de capillaires au sein de la tumeur appelé angiogénèse grâce à la sécrétion du VEGF (*Vascular Endothelium Growth Factor*) (Folkman 1971).



**Figure 16.** Processus en trois phases (initiation, promotion et progression) suite à l'administration d'un agent cancérigène à des modèles animaux de cancers primitifs (Liu et al 2015).

L'étiologie du cancer de la prostate est difficile à identifier. Des études épidémiologiques ont montré la combinaison de plusieurs facteurs comme le vieillissement, l'exposition à des carcinogènes ou des agents infectieux, les facteurs diététiques, les facteurs héréditaires et la signalisation des récepteurs hormonaux stéroïdes (Abate-Shen et Shen 2010).

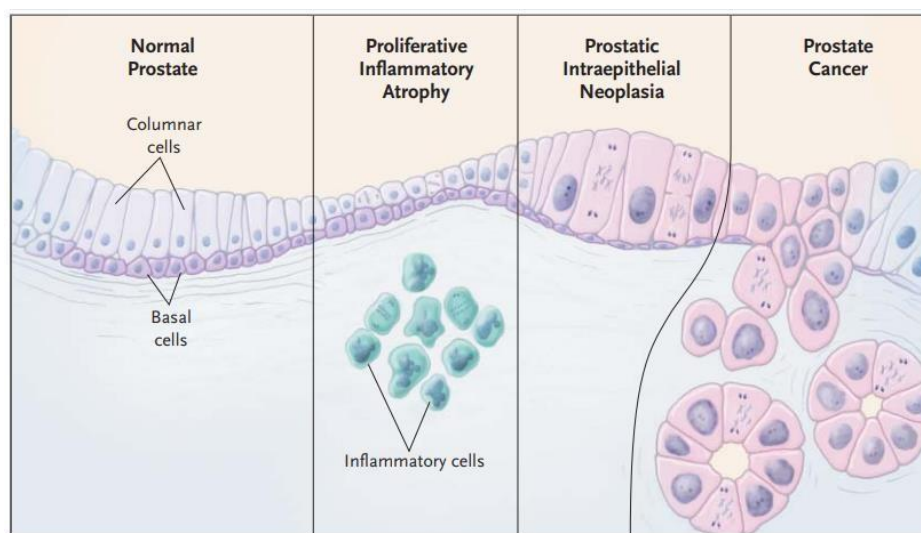
Il est bien établi que les cancers de prostate dérivent généralement de la transformation des cellules-souches saines de l'épithélium prostatique (Archer et al 2017, Freeland et al 2021). Cette situation est particulière car la plupart des autres cancers se forment par transformation maligne de cellules banales, car les cellules-souches sont généralement bien protégées contre la cancérogénèse (Feroni et al 2007).

L'adénocarcinome est le type de cancer de la prostate le plus fréquent dans plus de 90% des cas. Il se développe le plus souvent dans la zone périphérique. Les cellules à l'origine des tumeurs de la prostate sont, majoritairement, les cellules épithéliales. Les autres types de tumeurs prostatiques sont moins fréquents (Liedberg et al 2007, Beltran et al 2011, Martorana et al 2016) :

- ✓ Adénocarcinomes ductaux (environ 5% des cas) ;
- ✓ Cancers urothéliaux (environ 2,7% des cas) ;
- ✓ Cancer de la prostate à cellules squameuses (représentant 0,5 à 1% des cas) ;
- ✓ Cancers à petites cellules (appelés neuroendocriniens, représentant 0,5 à 2% des cas) ;
- ✓ Sarcomes prostatiques (cancers des cellules musculaires, environ 1% des cas) ;

Le CaP présente plusieurs phases évolutives :

1) **Lésions pré-cancéreuses** : L'initiation de la tumorigenèse prostatique est associée à la présence de lésions précancéreuses PIN (*Prostate Intraepithelial Neoplasia*). Ces lésions entraînent des changements dans les cellules prostatique et progressent ensuite vers la formation de carcinomes invasifs puis éventuellement de métastases (Shen et Abate-Shen, 2010). Les néoplasies de haut grade (HGPIN) sont des lésions de la prostate qui ressemblent aux lésions tumorales. Elles constituent une étape intermédiaire entre le tissu bénin et le cancer et sont retrouvées préférentiellement dans la zone périphérique de la prostate. Ces néoplasies sont caractérisés par la présence de cellules épithéliales présentant une prolifération accrue accompagnée de changements cytologiques à savoir, un élargissement du noyau, une chromatine dense et un nucléole proéminent. Contrairement aux tumeurs, la néoplasie PIN n'entraîne pas de rupture de la lame basale, n'envahit pas le stroma et la structure de l'acinus n'est que peu altérée (Tosoian et al 2018).



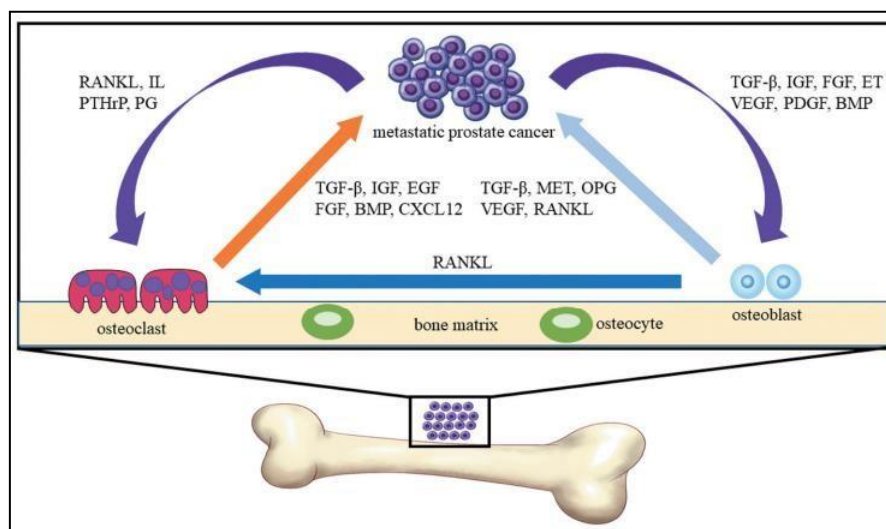
**Figure 17.** L'atrophie inflammatoire proliférative comme précurseur de la néoplasie intraépithéliale prostatique (PIN) et du cancer de la prostate (Nelson et al 2003).

2) **Le CaP cliniquement localisé** : Dans la première phase, la tumeur est limitée à la prostate. Avec le temps, la tumeur grossit et peut s'étendre au-delà de la capsule prostatique.

Au stade de cancer localement avancé, les cellules cancéreuses dépassent la capsule prostatique et infiltrent le tissu adipeux péri-prostatique entourant la glande.

3) **Cancer métastatique** : des cellules cancéreuses peuvent se détacher de la tumeur et envahir, préférentiellement, par un processus métastatique, d'autres parties du corps (les ganglions lymphatiques situés à proximité de la prostate, les os (Figure 18) et plus

tardivement, le foie et les poumons) *via* les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. La maladie évolue souvent lentement, sur plusieurs années (Yamamichi et al 2023).



**Figure 18.** Principales voies de signalisation dans la métastase osseuse du cancer de la prostate (Yamamichi et al 2023).

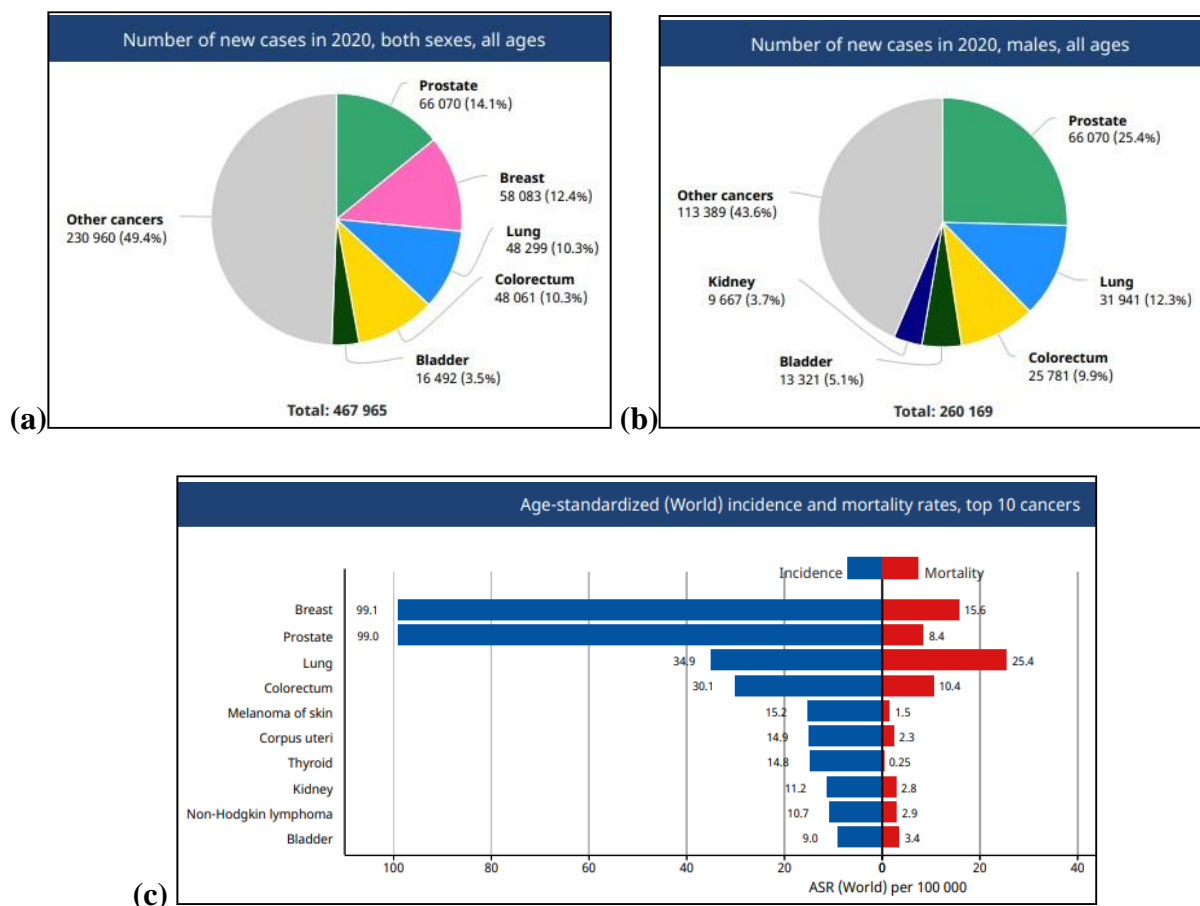
La matrice osseuse est riche en *transforming growth factor-β* (TGF-β), *insulin like growth factor* (IGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *bone morphogenetic protein* (BMP), etc... qui favorisent la progression du cancer (Song et al 2022). Ces facteurs interagissent pour former un système complet, formant une voie de rétroaction qui favorise la production de diverses cytokines, ce qui induit des métastases dans les os, et aggrave la croissance du cancer. Des interactions importantes entre le microenvironnement osseux et les cellules prostatiques métastatiques se produisent *via* des signalisations autocrines et paracrines. Cette activation du métabolisme osseux favorise diverses interactions coordonnées entre les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes avec leur microenvironnement (Wood et Brown 2020, Song et al 2022, Yamamichi et al 2023).

**4) Cancer résistant à la castration (CRPC)** : c'est une récurrence du cancer après traitement hormonal de première génération (castration médicamenteuse), car presque tous les patients voient leurs RA mutés au bout d'un certain temps. Nombreuses molécules ont été synthétisées visant à bloquer plusieurs étapes clés de la voie de signalisation du RA, y compris la liaison des androgènes au RA, la translocation nucléaire du RA activé et la liaison du RA activé avec l'ADN. Un autre type de castration chirurgicale par exérèse des deux testicules ou de la pulpe testiculaire peut aussi être réalisé. Cette technique irréversible supprime immédiatement la production de testostérone. Toutefois, elle est moins tolérée psychologiquement pour le patient que la castration médicamenteuse (Scott et Enzalutamide, 2018).

### 3.3.1. Épidémiologie du Cancer de la Prostate

Le CaP constitue un problème de santé publique. En effet, il représente le premier cancer diagnostiqué chez l'homme de plus de 50 ans. Selon les statistiques récentes (Globocan, 2022) le nombre des nouveaux cas de cancer de la prostate chez les hommes dans le monde était de 1,414 259 (7.3%), le plaçant au 4<sup>ème</sup> rang en termes d'incidence dans la population (hommes et femmes confondus) et au 2<sup>ème</sup> rang chez les hommes. Le nombre de patients décédés d'un CaP était de 375,304 (3.8%) en 2020. Le CaP est la 8<sup>ème</sup> cause de décès par cancer dans le monde après le cancer du poumon, du colon, du foie, de l'estomac, du sein, de l'œsophage et du pancréas. Il représente la 5<sup>ème</sup> cause de décès chez les hommes. Il existe de grandes disparités entre les pays avec globalement une incidence très élevée dans les pays occidentaux (Sung et al 2021).

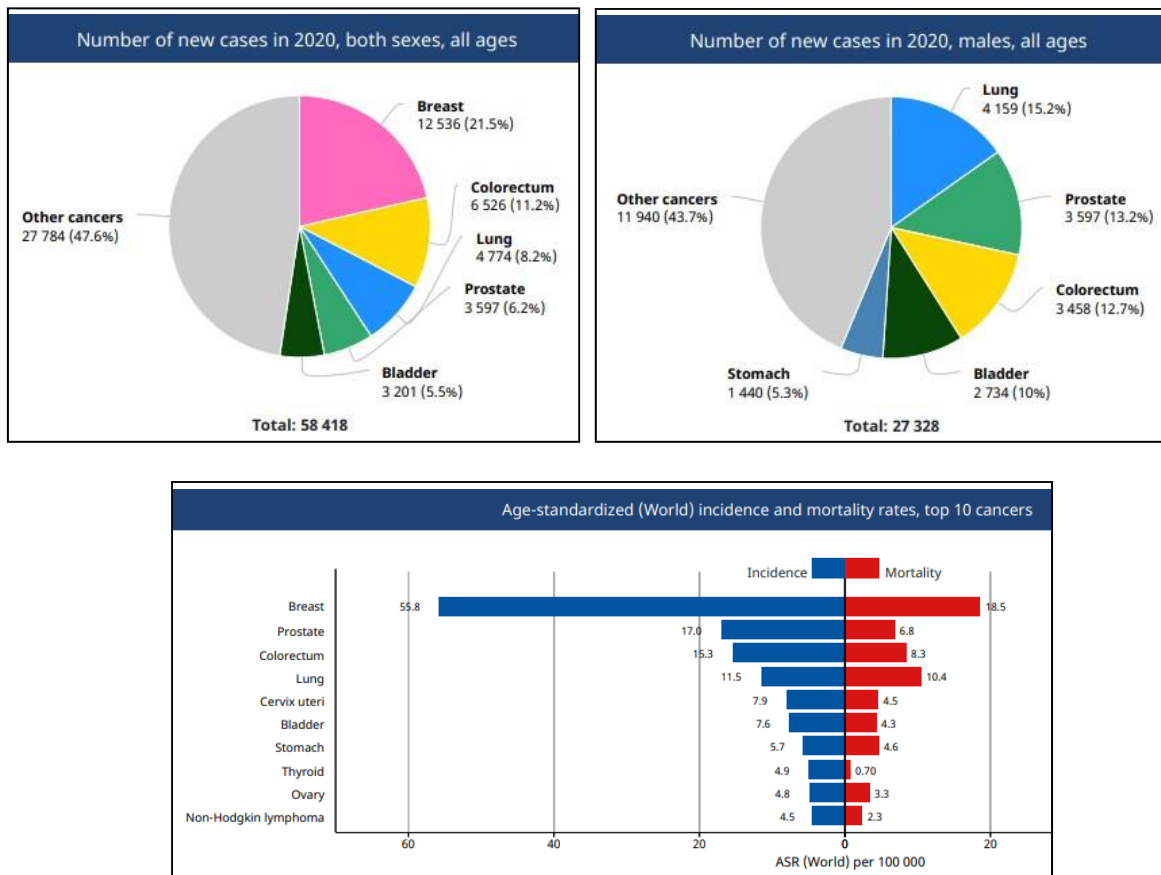
En France, on estime à plus de 66 070 (14.1%) le nombre de nouveaux cas de CaP (Figure 19)



**Figure 19.** (a) Nombre des nouveaux cas de cancer chez les deux sexes en France. (b) Nombre des nouveaux cas de cancer chez l'homme en France. (c) Estimation des taux d'incidence et de mortalité en France (Globocan, 2022).

diagnostiqués en 2020. Le nombre de décès lié au cancer de la prostate était estimé à 9 060, soit 4.9 % des décès par cancer chez l'homme. le CaP est classé 6<sup>ème</sup> cause de décès par cancer derrière les cancers du poumon, du colon, du foie et de l'estomac chez l'homme (Globocan, 2022).

En Algérie, le nombre de nouveaux cas du CaP observé en 2020 s'élevait à 3597 cas (6.2%) (Figure 20). Leur nombre pourrait augmenter jusqu'à 150390 cas dans 5 ans. Le taux de mortalité augmente avec l'âge. La mortalité voit une augmentation en 2020 avec un nombre de 1635 (5.0%) décès (Globocan, 2022).



**Figure 20.** (a) Nombre des nouveaux cas de cancer chez les deux sexes en Algérie. (b) Nombre des nouveaux cas de cancer chez l'homme en Algérie. (c) Estimation des taux d'incidence et de mortalité en Algérie (Globocan, 2022)

La mortalité liée au CaP est en baisse constante depuis les années 1990. Cette diminution du taux de mortalité pourrait s'expliquer en partie par : i) l'utilisation du PSA qui a permis de diagnostiquer des tumeurs au stade localisé et donc accessible à un traitement curatif, ii) l'amélioration des traitements qui a permis de prolonger la vie des patients métastatiques grâce à l'émergence de nouvelles classes thérapeutiques, telle que l'hormonothérapie, et iii)

l'accès au dépistage permettant de diagnostiquer les cancers à un stade précoce (Schröder et al, 2014).

### **3.3.2. Les facteurs de risque du cancer de la prostate**

Pour une maladie aussi fréquente que le CaP, on sait relativement peu de choses sur son étiologie. A ce jour, les facteurs de risque établis se limitent à l'âge avancé, aux antécédents familiaux, aux prédispositions génétiques, à certaines mutations (par exemple, BRCA1 et BRCA2) et certaines affections (syndrome de Lynch) ou encore à l'origine géographique et notamment l'appartenance à la population africaine, afro-américaine ou caribéenne (ethnie). Les hommes noirs des États-Unis et des Caraïbes ont l'incidence la plus élevée et présentent les taux d'incidence les plus élevés au monde (Rebbeck et al 2013).

Peu de facteurs liés au mode de vie et à l'environnement ont été identifiés à ce jour pour lesquels les résultats sont contradictoires, bien qu'ils puissent s'accumuler pour le tabagisme, l'excès de poids, les syndromes métaboliques et certains facteurs nutritionnels susceptibles d'augmenter le risque de CaP avancé (Esposito et al 2013, Carter et al 2015, Mottet et al 2017).

### **3.3.3. Diagnostic du cancer de la prostate**

La grande majorité des cas de CaP au stade précoce localisé sont asymptomatiques. Le CaP est le plus souvent suspecté sur une augmentation du taux sérique de PSA. Les symptômes les plus souvent retrouvés sont une hématurie ou une obstruction des voies urinaires. Plus tardivement, la dissémination métastatique de la tumeur peut causer des œdèmes des membres inférieurs par compression des ganglions lymphatiques régionaux ou des douleurs osseuses souvent au niveau des vertèbres, le bassin ou les côtes (Beer et al 2014, Albertsen 2020).

La détection du CaP repose sur le dosage du PSA et l'examen clinique de la prostate par le toucher rectal. Toutefois, la biopsie de la prostate demeure la meilleure technique de diagnostic définitif du CaP sur les carottes de biopsie de la prostate ou les pièces opératoires pour la détection des cellules cancéreuses dans la prostate lors de l'examen histopathologique (Serefoglu et al 2013). Plus récemment l'IRM et la scintigraphie de la prostate ont confirmé leur importance diagnostique du CaP. En effet, ils permettent d'évaluer les atteintes extraprostatiques et de détecter la présence de métastases dans les formes les plus avancées (Galani 2015, Ploussard et al 2022).

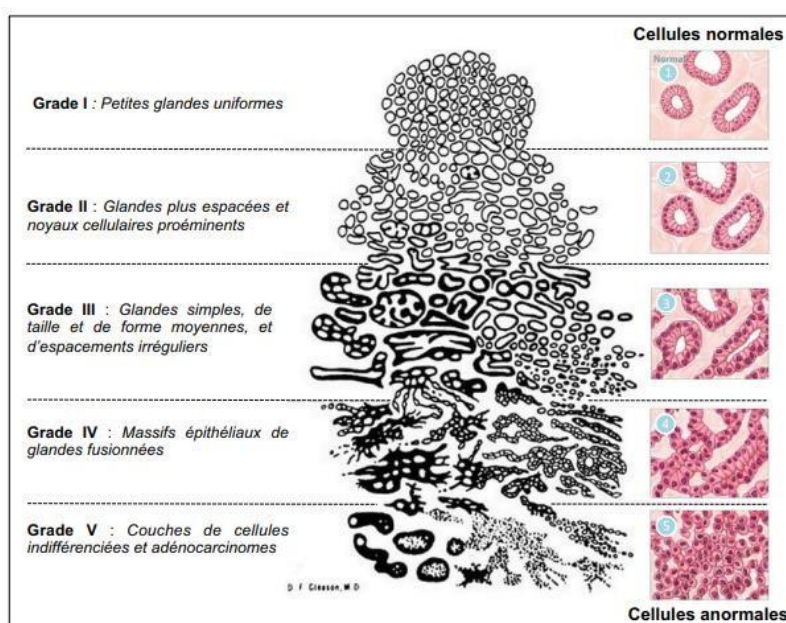
Le PSA est une glycoprotéine androgéno-régulée à activité sérine-protéase de la famille des kallikréines produite par la prostate. Il est spécifique seulement d'organe, mais il n'est pas spécifique du CaP. Toutefois, le dépistage systématique du PSA reste l'un des meilleurs tests cliniques pour le CaP (Zappa 2014) et reste d'une utilité indéniable pour le suivi du traitement et des récidives (Wallace et al 2014). La majorité des hommes sains présentent un taux de PSA sanguin  $< 4$  ng/ml. Ainsi, l'augmentation rapide de sa concentration ( $> 4$ ng/ml) est un élément suspect du cancer. L'utilisation de ce biomarqueur sérique reste controversée, car dans le contexte clinique, le PSA ne permet pas de distinguer les maladies indolentes des maladies agressives de haut grade. Un pourcentage important d'affections prostatiques non malignes et ne présentant aucun symptôme peuvent entraîner une élévation du taux de PSA sérique donnant lieu à un nombre considérable de résultats faussement positifs, ce qui réduit sa spécificité et entraîne un surdiagnostic et un surtraitement (Schröder et al 2009, Van Poppel et al 2021)

Le seul moyen permettant d'affirmer avec certitude la présence d'un cancer est de réaliser une analyse anatomopathologique après une biopsie prostatique guidées par échographie transrectale (TRUS) ; c'est la méthode la plus largement acceptée pour prélever au minimum 12 fragments (carottes) de tissu prostatique par voie transrectale (à travers la paroi du rectum) dans différentes parties de la prostate (Pal 2012).

a) **Le score de Gleason :** L'agressivité du cancer est évaluée sur des prélèvements de biopsie (10 à 12 carottes) permettant de cartographier la prostate qui se développe souvent en multiples foyers (Ploussard et al 2022). Cette méthode permet de définir le grade de la tumeur sur la base du score de Gleason (Gleason et Mellinger 1974, Gleason 1992) qui reste depuis plus de 60 ans, le critère pronostic le plus important dans la prise en charge du CaP. Ce score résulte de la somme des 2 profils histologiques les plus représentés dans la tumeur. Ce score s'échelonne entre 6 et 10 ; le score 6 correspond à des cancers peu agressifs, et le score 10 à des cancers très agressifs (Epstein et al 2016). Le problème majeur de ce grade est qu'il regroupe des cancers du groupe 7 (3+4) et 7 (4+3) dont les pronostics sont très différents. En effet, les cancers du groupe 7 (4+3) progressent plus rapidement et forment plus de métastases (Chan et al 2000). Il en est de même pour les scores 8 et 9-10 dont le pronostic n'est pas le même. Ceci a conduit à la mise en place d'une nouvelle stratification acceptée majoritairement lors de la conférence de consensus de l'ISUP (*International Society of Urological Pathology*) de 2014 et recommandée par l'OMS, et qui permet notamment de faire la différence

entre les tumeurs de score de Gleason 7 selon le grade majoritaire (Figure 21) Elle est basée sur une échelle représentant le degré de différenciation des cellules tumorales par des valeurs allant de 1 à 5. La valeur pronostique de cette classification a été validée par une étude multicentrique (Epstein et al 2016) :

- Grade 1 (scores de Gleason  $\leq 6$ ) : 96% de survie sans rechute après prostatectomie
- Grade 2 (score de Gleason 7 = 3+4) : 88%
- Grade 3 (score de Gleason 7 = 4+3) : 63%
- Grade 4 (score de Gleason 8) : 48%
- Grade 5 (scores de Gleason 9 – 10) : 26%



**Figure 21.** Vue schématique de l'histologie prostatique selon la classification de Gleason.

b) **Classification TNM (Tumor, Nodes, Metastasis)** : c'est un système international permettant de classer les cancers selon leur expansion anatomique. Le stade tumoral décrit l'étendue de la dissémination au moment du diagnostic. Cette classification est symbolisée par 3 lettres : l'étendu de la tumeur primitive (T), l'infiltration des ganglions lymphatiques voisins (N), la présence d'éventuelles métastases (M). Chaque lettre est suivie d'un chiffre correspondant à des critères cliniques permettant de caractériser l'envahissement tumoral (Ploussard et al 2022).

Le stade T se divise en 4 catégories :

- T1 : la tumeur est indétectable cliniquement, ni palpable ni visible à l'imagerie ;
- T2 : la tumeur est confinée dans la prostate mais palpable ou visible à l'imagerie ;
- T3 : la tumeur a franchi la capsule prostatique ou envahi le col vésical ou les vésicules séminales ;
- T4 : la tumeur s'est répandue dans des tissus en dehors de la prostate et des vésicules séminales ;

c) **La classification de D'Amico** : est basée sur la combinaison de 3 critères : le stade TNM, le score de Gleason, et la valeur du PSA. Cette classification permet d'évaluer le potentiel d'agressivité des tumeurs localisées et de mettre en place le traitement le plus approprié (D'Amico et al 1998), Elle est divisée en 3 niveaux de risque de progression du CaP (Tableau 2) : un risque faible, un risque intermédiaire et un risque élevé. Toutefois, cette classification présente des limitations, et en particulier pour les patients avec un score de Gleason 7.

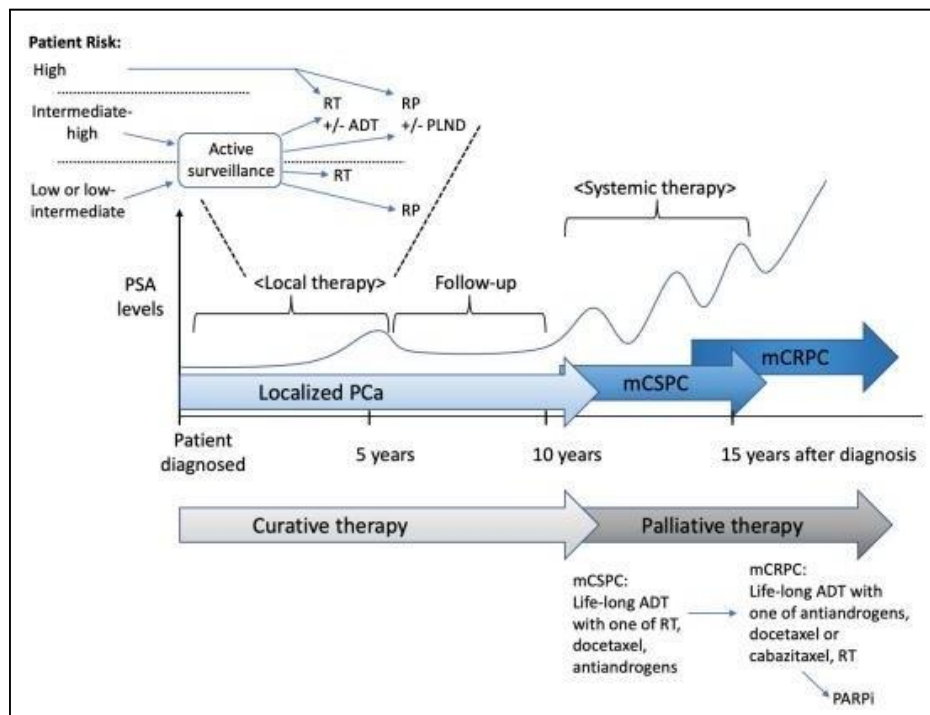
**Tableau 2.** Evaluation de l'agressivité du cancer de la prostate selon la classification de D'Amico

Groupe	Définitions	Pronostic de rechute à 5 ans
Faible risque	PSA ≤ 10ng/ml + Gleason ≤ 7 + Stade clinique T1c ou T2a	< 25%
Risque intermédiaire	PSA entre 11 et 20 ng/ml ou Score de Gleason = 7 ou Stade clinique T2b	25-50%
Risque élevé	PSA > 20ng/ml ou Score de Gleason > 7 ou Stade clinique T2c	> 50%

d) **L'IRM (Imagerie par résonance magnétique)** : Selon les dernières recommandations, tout homme présentant un risque de cancer de la prostate devrait effectuer une IRM de la prostate avant d'effectuer une biopsie de la prostate. Cette évolution dans le diagnostic du PCa a amélioré la capacité des cliniciens à classer les patients en fonction du risque et à proposer un traitement adapté basé sur le pronostic de la tumeur et de la prédilection du patient (Ploussard et al 2022).

### 3.3.4. Traitement du cancer de la prostate

Le traitement du cancer de la prostate dépend étroitement du stade lors du diagnostic initial (par les taux sanguins de PSA, l'IRM et/ou une biopsie tissulaire) et des situations cliniques. La surveillance active est le traitement de référence pour les tumeurs de faible risque évolutif. Différentes thérapies sont actuellement utilisées : pour les maladies localisées ou localement avancé la thérapie préconisée est la déprivation androgénique (ADT), l'intervention chirurgicale (prostatectomie totale) et la radiothérapie pouvant être associée à une hormonothérapie (Figure 22). Ces traitements peuvent être utilisés en monothérapie ou combinés pour les maladies à haut risque, ce qui peut améliorer la qualité du traitement (Klotz 2017). La radiothérapie de rattrapage précoce est recommandée en cas de récurrence biologique post-prostatectomie totale. L'imagerie (IRM), notamment moléculaire, permet d'orienter la prise de décision en cas de récurrence biologique après traitement local, mais ne doit pas retarder la radiothérapie de rattrapage précoce en cas de récurrence biologique post-prostatectomie totale (Nolsøe et al 2020, Ploussard et al 2022).



**Figure 22.** Présentation générale de la prise en charge du CaP. ADT : androgen deprivation therapy ; PARPi : inhibiteur de la poly(adénosine diphosphate-ribose) polymérase ; PLND : dissection des ganglions lymphatiques pelviens ; RP : prostatectomie radicale ; RT : radiothérapie (Wasim et al 2022).

L'ADT qui est l'une des formes les plus courantes du traitement du CaP avancé, inclue la castration chimique par l'utilisation d'antagonistes de AR mais aussi les thérapies combinées faisant appel à des agonistes ou des antagonistes de la LHRH (*Luteinizing Hormone-releasing Hormone*) qui vont bloquer la sécrétion de LH et donc la production de testostérone testiculaire. L'association de la radiothérapie et de l'ADT a montré une amélioration de la survie dans plusieurs essais (Shafi et al 2013).

La majorité des patients répondent initialement au blocage des androgènes. Malheureusement, au bout de deux ans ils développent une résistance et un échappement androgénique et se transforment en CRPC indépendant des androgènes, très agressif et réfractaire aux thérapies hormonales conventionnelles (Agoulnik et Weigel 2006, Devlin et Mudryj 2009). Dans cette phase, le traitement du CRPC consiste à inhiber l'axe androgène-récepteur. La chimiothérapie par taxanes et les hormonothérapies de 2<sup>nd</sup> génération ciblant le récepteur des androgènes ou le CYP450 seront proposées (Berthold et al 2008, Beer et al 2014).

Pour examiner l'extension de la maladie, il faudrait vérifier les vésicules séminales, le rectum, le bas de la vessie et les ganglions lymphatiques situés à proximité de la prostate via imagerie par résonance magnétique (IRM) pelvi-prostatique, TDM (scanner) abdomino-pelvienne.

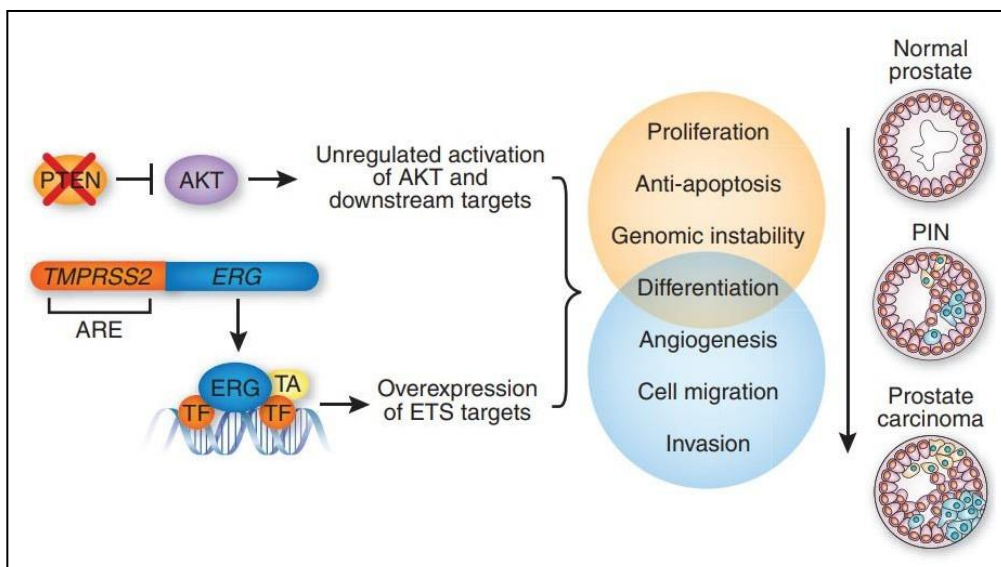
La recherche des métastases osseuses, ganglionnaires ou viscérales est réalisée par scintigraphie osseuse, IRM corps entier et enfin TEP-Scan (tomographie par émission de positons) à la fluorocholine pour rechercher la présence éventuelle de métastases

Le CaP est unique en ce que l'os est souvent le seul site de métastase cliniquement détectable et forment des métastases de type ostéoblastique (formation d'os) plutôt qu'ostéolytiques (lyse osseuse) (Logothetis et al 2015).

### **3.3.5 Mécanismes moléculaires de la cancérogénèse prostatique**

L'initiation de la transformation oncogénique principalement par mutation, modifications épigénétiques, réarrangements chromosomiques ou changements dans la méthylation de l'ADN peut être attribuée à l'activation de voies promouvant la croissance cellulaire en relation avec la signalisation androgénique. Ceci entraîne la perte du suppresseur de tumeur PTEN (*phosphatase and tensin homolog gene*), souvent complète chez les tumeurs de hauts grades, et l'activation concomitante des voies de signalisation pro-prolifératives PI3K-AKT sous la dépendance de la signalisation androgénique. Ces voies pourraient agir en association

avec la protéine TMPRSS2 (*Transmembrane protease, serine 2*) qui fusionne avec un membre de la famille des facteurs de croissance ETS (*E26 transformation-specific*), ERG (*Erythroblast transformation specific*), classé comme proto-oncogène. Cette fusion, qui correspond à la mutation génétique la plus fréquente (détectée dans environ 50 % de toutes les tumeurs de la prostate), favorisera la progression vers le CaP par des mécanismes qui augmentent le pouvoir sélectif des néoplasies intraépithéliales prostatiques (PIN) (Figure 23) (Sharrocks 2001, Squire 2009, Phin 2013, Dell’atti et Aguiari 2023). Des tests immunohistochimiques validés ont fourni des preuves évidentes que la perte de PTEN est associée à l’agressivité du cancer de la prostate (Lotan et al 2015).

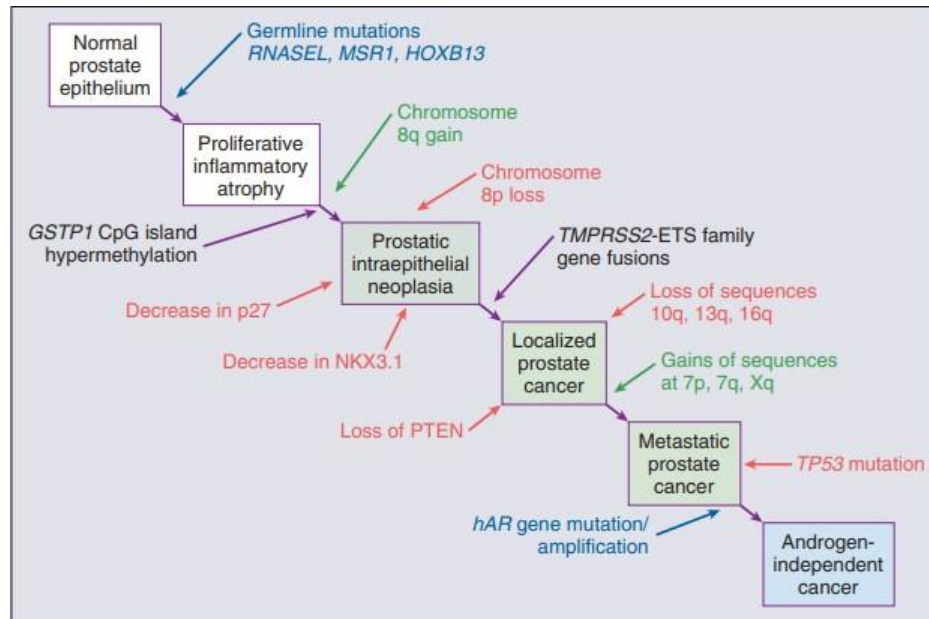


**Figure 23.** Voies impliquées dans la progression néoplasique du CaP à partir de l’épithélium prostatique. Les différentes étapes de la carcinogenèse prostatique sont représentées et associées avec les différents processus biologiques et altérations moléculaires. ARE, éléments de réponse aux androgènes ; TA, activateur transcriptionnel ; TF, facteur de transcription (Squire 2009).

D’autres lésions couramment observées dans le CaP comprennent des mutations dans différents gènes clés régulateurs du métabolisme cellulaire, tels que HOXB13, GSTP1, NKX3.1, TMPRSS2, PTEN, AR, P53, etc... (Figure 23) (Nelson et al 2020, Dell’atti et Aguiari 2023). Ces mutations peuvent affecter la progression du cancer et la réponse au traitement.

Le proto-oncogène MYC est un facteur de transcription qui régule une pléiade de gènes impliqués dans la prolifération, la croissance, l’apoptose et la différenciation cellulaire. La région chromosomique contenant l’oncogène Myc (8q24) est fréquemment amplifiée, dans un grand nombre de tumeurs prostatiques de stade avancé (Sato et al 2008). L’accumulation observée dans les PIN et dans les carcinomes suggère la surexpression de MYC dans l’initiation du

cancer (Gurel et al 2008). La diminution de l'expression de NKX3.1 (*NK3 Homeobox 1*) entraîne l'initiation précoce de la tumorigénèse prostatique (Abate-Shen et Shen 2010).



**Figure 24.** La pathogénèse moléculaire du cancer de la prostate (Nelson et al 2020).

Certains CaP héréditaires associées à un risque plus élevé de CaP, impliquent une combinaison défavorable de variants génétiques tel que le gène suppresseur de tumeur BRCA2 ou le gène HOXB13, impliqué dans la régénération cutanée (Cooney 2017, Pilie et al 2016)

#### 4. Rôle de la ghréline dans le cancer de la prostate

Beaucoup de travaux ont suggéré que le développement tumoral, y compris les métastases, est favorisé par la ghréline acylée (AG), forme active qui interagit avec le GHSR entraînant une prolifération cellulaire importante et une inhibition de l'apoptose, ainsi qu'un métabolisme tumoral et l'angiogénèse (Hoxhaj et Manning 2020). Dans la pathophysiologie de certains cancers, l'expression de l'ARNm de la ghréline a été détectée dans des tissus tumoraux tels les adénomes hypophysaires, les tumeurs neuroendocrines, les carcinomes thyroïdiens et médullaires thyroïdiens ainsi que dans des tumeurs endocrines du pancréas et des poumons (Korbonits et al 2001, Kanamoto et al 2001, Korbonits et al 2001, Papotti et al 2001). Ces effets prolifératifs de l'AG semblent être médiés par la voie Ras/PI3K/Akt/mTOR dépendante de GHSR-1a (Figure 23) (Lin et Hsiao 2017, El-Kott et al 2019, Karimi et al 2021). Un isoforme tronqué de GHSR-1a, GHSR de type 1b, a été trouvée dans la majorité des tumeurs et

des lignées cellulaires cancéreuses, mais son rôle potentiel dans la régulation des tumeurs demeure inconnu.

Tout comme la ghréline acylée (AG), la ghréline désacylée (UAG) est également capable de stimuler la phosphorylation de l'Akt et la prolifération cellulaire dans l'adénocarcinome gastrique (Spiridon et al 2021) et les cellules bêta du pancréas. Du fait qu'UAG est incapable de se lier à GHS-R1a, cela soutient l'idée qu'un autre récepteur inconnu pourrait médier certains des effets de l'UAG sur les cellules bêta du pancréas (Granata et al 2007, Tian et Fan 2012).

La ghréline et le GHS-R sont également impliqués dans la physiopathologie du CaP. Les carcinomes prostatiques humains et les néoplasmes bénins expriment l'ARNm de la ghréline et du GHS-R (Cassoni et al 2004). Dans le tissu prostatique normal, l'expression de l'ARNm de la ghréline est indétectable, ce qui suggère que la ghréline est impliquée dans la pathogenèse du CaP. La ghréline et ses analogues modulent la prolifération de diverses lignées tumorales prostatiques.

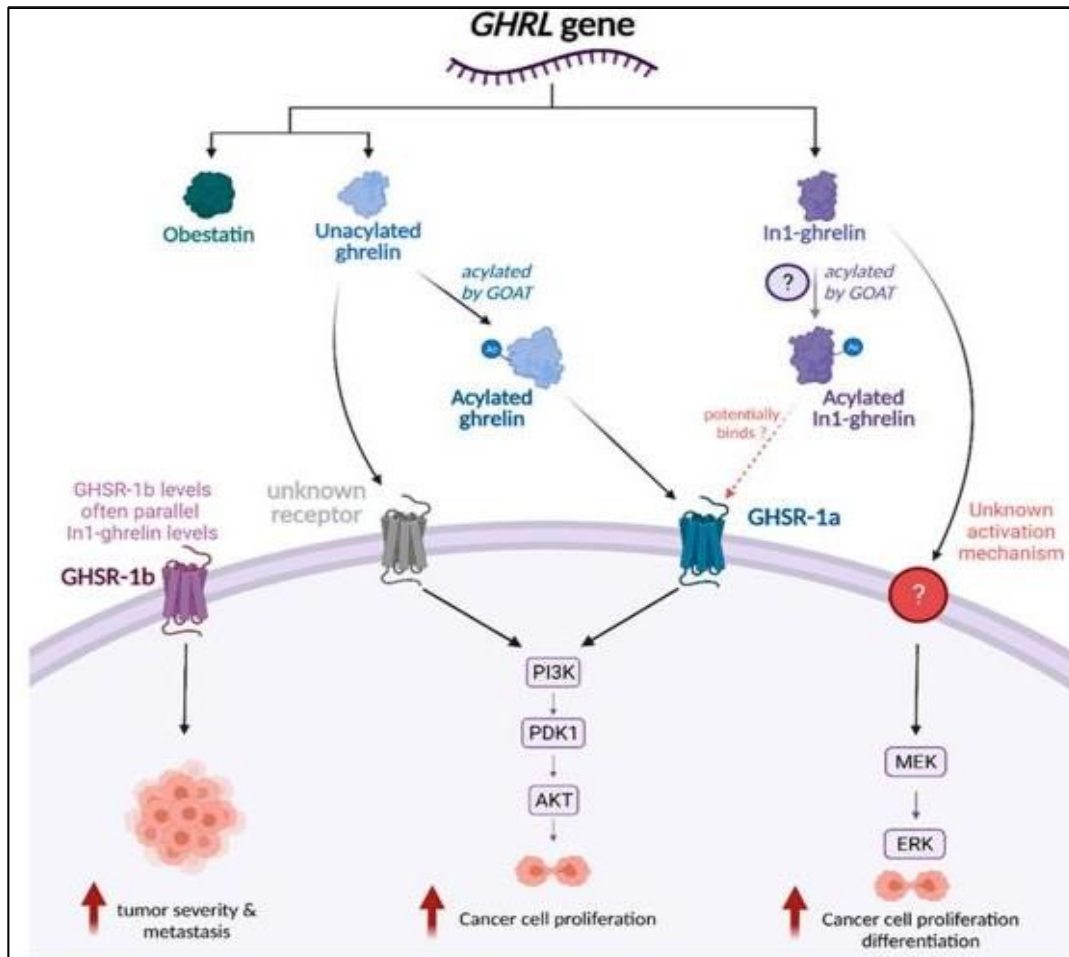
Ce résultat est controversé, car certaines études suggèrent un effet prolifératif sur la croissance des cellules cancéreuses (Yeh et al 2005), tandis que d'autres observent une action stimulante à la dose physiologique et une action inhibitrice à la dose pharmacologiques (Cassoni et al 2004). Cette controverse concerne deux domaines principaux : d'une part, les résultats controversés des effets locaux de la ghréline sur différents types de lignées cellulaires cancéreuses humaines ; d'autre part, le désaccord apparent entre les résultats des études *in vitro* et des études cliniques portant sur l'association de la ghréline à un type de cancer. Ces incohérences ont entravé les indications permettant de considérer la ghréline comme un biomarqueur tumoral ou un agent thérapeutique potentiel chez les patients atteints de cancer (Soleyman-Jahi et al 2019).

A l'heure actuelle, il n'a pas encore été rapporté si l'expression de la ghréline et de ses récepteurs dans les cellules tumorales protègent contre la néoplasie ou s'ils stimulent la carcinogénèse (Spiridon et al 2021).

Il est intéressant de noter que l'expression de GOAT, l'enzyme responsable de l'acétylation de la ghréline, est significativement élevée dans les cellules cancéreuses humaines de la prostate (Hormaechea-Agulla et al 2016).

Parmi les variants d'épissage de la ghréline associés au cancer, le variant In1-ghréline, est fortement exprimée dans plusieurs cancers, dont ceux du sein, de l'hypophyse et les cancers

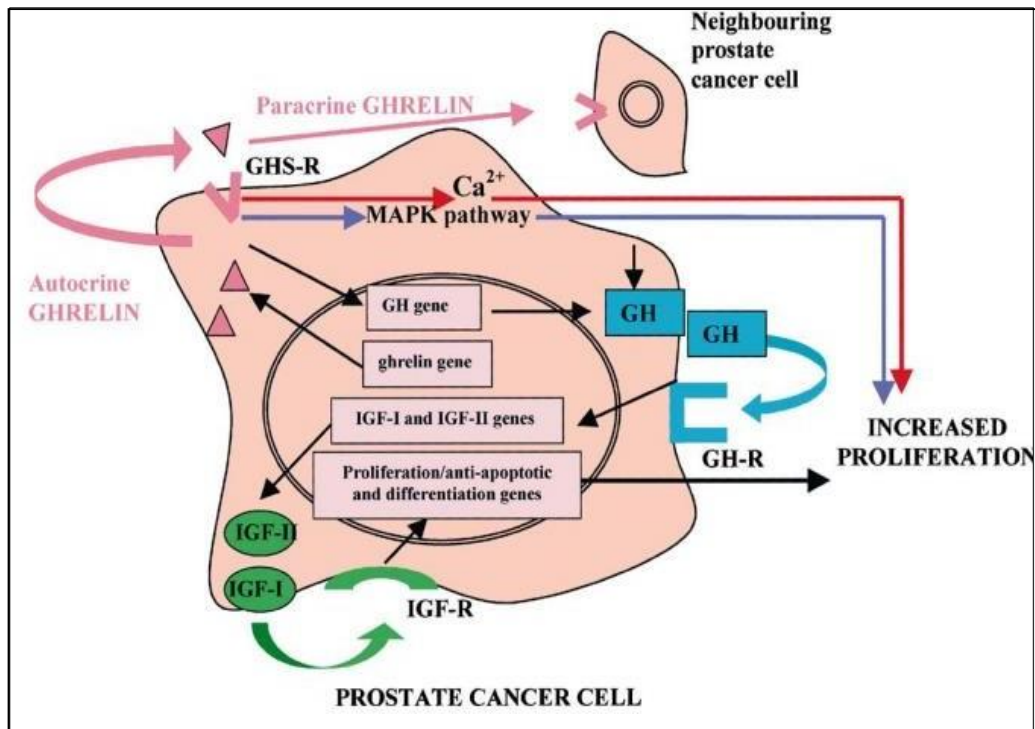
neuroendocriniens (Ibanez-Costa et al 2015, Luque et al 2015, Rincon-Fernandez et al 2018). De même, dans le cancer de la prostate à haut risque, l'In1-ghréline est significativement élevée à la fois dans les échantillons de plasma et de tissus par rapport aux témoins sains (Hormaechea-Agulla et al 2017).



**Figure 25.** Modèle proposé illustrant les voies par lesquelles l'axe de la ghréline exerce des effets prolifératifs sur les cellules cancéreuses (Kotta et al 2022).

L'UAG (*unacylated ghrelin*) et l'AG (*acylated ghrelin*) activent tous deux la voie PI3K/Akt et stimulent la prolifération des cellules cancéreuses à faibles doses, bien que l'AG agisse d'une manière dépendante du GHS-R1a (*growth hormone secretagogue receptor*) tandis que le mécanisme d'activation de l'UAG est inconnu. Il a été constaté que l'In1-ghréline active la voie MAPK/ERK par le biais d'un mécanisme qui n'a pas encore été découvert. Les niveaux d'in1-ghréline étaient en corrélation avec les niveaux de GOAT (*ghrelin O-acyltransferase*), ce qui suggère que l'acylation et l'activation correspondante de GHS-R1a sont possibles, bien que l'in1-ghréline n'ait pas été signalée comme modifiant la phosphorylation d'Akt. Les niveaux de GHS-R1b sont souvent parallèles aux niveaux d'In1-ghréline et ont été associés à une augmentation de la gravité des tumeurs et des métastases.

La ghréline est un puissant régulateur de l'axe GH/IGF-I qui est fréquemment impliqué dans le développement de plusieurs néoplasmes. La ghréline peut induire une sécrétion endogène de GH par la prostate qui, à son tour, déclenche la production et la sécrétion autocrine d'IGF-I. Par ailleurs, l'activation du GHS-R et des voies de signalisation qui en découlent peuvent elles-mêmes entraîner une prolifération cellulaire (Figure 26) (Jeffery et al 2003).



**Figure 26.** L'effet médié par la ghréline, systémique et/ou produite localement, sur la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate (Jeffery et al 2003).

La ghréline peut stimuler l'axe GH/IGF par l'activation du GHS-R, ce qui entraîne une augmentation de la production de GH, d'IGF-I et d'IGF-II. Alternativement, la ghréline peut intensifier la prolifération cellulaire par l'activation de la voie de la protéine kinase C (en rouge) ou par l'activation des MAP kinases (en bleue) (Jeffery et al 2003).

#### **4.1. Polymorphisme SNP et haplotypes**

Les polymorphismes nucléotidiques simples (SNPs) constituent la plus importante source de variation génétique dans le génome humain. Ils correspondent à des séquences d'ADN ne différant que par une seule paire de bases (Lamoril et al 2003). On estime qu'environ 90 % de la variation des séquences d'ADN chez l'homme est due à des SNPs. Notre génome contiendrait entre 3 et 17 millions SNPs. Parmi ceux-ci, 5 % ont lieu dans les gènes. Les SNPs constituent donc un marqueur moléculaire présent dans le génome à une densité très élevée et pouvant être utilisés pour cartographier les gènes impliqués dans les maladies humaines. Les SNPs sont essentiels pour prédire le risque de survenu d'une pathologie et pour ouvrir la voie à des cibles thérapeutiques ; des études suggèrent qu'il existe une forte association dose-dépendante.

Ces variations génétiques sont à l'origine des différences de susceptibilité à la maladie, la gravité de la maladie et la façon dont notre corps réagit aux traitements. Plus de cent millions de SNPs connus ont été identifiés et répertoriés. La plupart de ces SNPs se trouvent dans des séquences d'ADN qui ne codent pas directement pour des acides aminés (introns et régions intergéniques)... Ces SNPs affectent l'épissage des gènes, la fixation des facteurs de transcription, la dégradation de l'ARN messager et d'autres facteurs influençant la transcription, la traduction des gènes et la traduction de l'ARNm en protéines (Eeles et al 2013).

L'association de SNPs dans une région du génome située sur un même chromosome s'appelle un haplotype. Certains SNPs proches physiquement sur le génome ont tendance à être transmis en bloc (Lamoril et al 2003). Il importe donc d'en tenir compte lors d'études d'associations puisque cette diversité haplotypique peut être beaucoup plus informative et surtout représentative de la réalité que si chaque SNP n'est considéré qu'individuellement (Liu et al 2005).

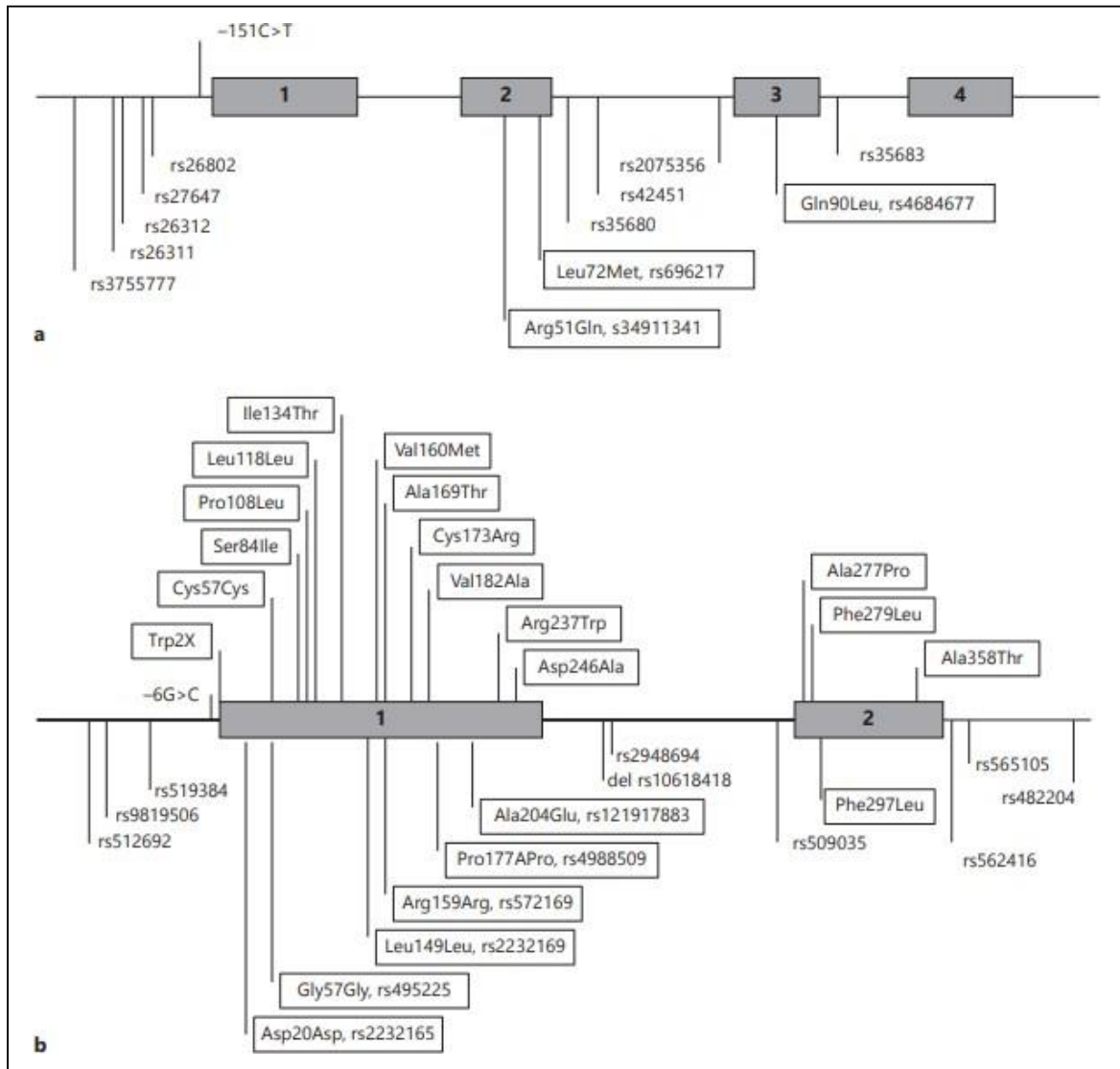
Il a été décrit que les polymorphismes de nucléotides simples (SNPs) dans les gènes codant pour la ghréline et son récepteur (Figure 27) pourraient être impliqués dans l'étiologie de plusieurs maladies métaboliques et cancéreuses. Les données de la littérature concernant l'association de la ghréline et de son récepteur à différentes pathologies sont controversées. Cette controverse concerne deux domaines principaux : d'une part, les résultats des effets locaux de la ghréline sur différents types de lignées cancéreuses humaines, et d'autre part, le conflit apparent entre les résultats *in vitro* et cliniques de l'association de la ghréline à un seul

type de cancer. Ces incohérences ont empêché la considération de la ghréline comme biomarqueur tumoral ou agent thérapeutique potentiel chez les patients atteints de cancer (Soleyman-Jahier al 2019).

Ainsi, les polymorphismes du gène de la ghréline ont été associés au diabète de type 2, à l'obésité et à l'hypertension. Le polymorphisme L72M (Leu72Met, rs696217) a été associé à une moindre accumulation de graisse et à un risque plus faible de troubles métaboliques (Ukkola et al 2002), tandis que le variant R51Q (Arg51Gln, rs34911341) était associé à des taux plasmatiques plus faibles de ghréline et obésité (Poykko et al 2003).

Dans une étude cas-témoins regroupant 648 cas/659 témoin, aucun des SNPs du gène GHRL n'a été associé au risque de cancer du sein (Feigelson et al 2008). Toutefois, une autre étude a fait état d'associations entre certains polymorphismes (allèle GHRL rs171407-G et le génotype GHS-R 2948694-GG) avec un risque accru de cancer du sein (Dossus et al 2008). Wagner et al (2006), ont montré une association du SNP Gly57Gly de GHS-R avec un risque accru, et une association de certains haplotypes rares de GHRL avec un risque réduit du cancer du sein. Des différences dans la distribution des sous-types de cancer du sein, dans de la taille de l'échantillon, de l'ethnicité et de l'âge des populations étudiées pourraient expliquer les résultats controversés. Une autre étude plus récente a montré que le génotype GHRL rs27647-GG était corrélé à une mortalité plus faible, toutes causes confondues, alors que l'allèle GHRL rs3755777-C conférait un avantage en termes de survie globale (Pellatt et al 2015).

Dans une étude cas-témoins, (Campa et al 2010) ont mis en évidence une association des allèles GHRL rs27647-T et rs35683-C, à une diminution du risque de cancer colorectal dans une population tchèque, mais pas allemande.



**Figure 27.** a) Prépro-ghréline (chromosome 3p25.3). Les polymorphismes communs du gène de la ghreline (GHRL) (en bas) et les variantes rares (en haut) rapportés dans la littérature. b) GHS-R (chromosome 3q26.31). Gène du récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance (GHS-R) : polymorphismes communs (en bas) et variants rares (en haut) rapportés dans la littérature.

Les études d'association entre des variants alléliques et le risque de survenue d'une maladie sont basées sur le calcul des rapports de cotes (RC) ou le risque relatif. C'est une mesure de l'association entre un génotype (c'est-à-dire la présence de la variante dans le génome) et un phénotype (c'est-à-dire le fait d'être atteint d'une maladie ou d'une affection) et peut être utilisé pour les maladies mendéliennes ou les traits complexes.

Bien que le risque relatif soit différent du RC, le risque relatif se rapproche asymptotiquement du RC pour les petites probabilités. Un RC de 1,0 signifie que la variante n'affecte pas les chances d'être atteint de la maladie, des valeurs supérieures à 1,0 signifient qu'il existe une

association entre la variante et la maladie, et celles inférieures à 1,0 signifient qu'il existe une association négative entre la variante et le risque de maladie. En général, les variants ayant une taille d'effet mendélien modeste auront un RC de 3 ou plus, tandis que les variants à forte pénétration auront des RC très élevés (Richards et al 2015).

Les SNPs du gène de la ghréline les plus étudiés jusqu'à ce jour sont : Gln90Leu situé dans la partie du précurseur qui code pour l'obestatine (rs4684677) et la Leu72Met dans la partie du précurseur entre ghréline et obestatine (rs696217) (Tableau 2). (rs696217) est un polymorphisme non synonyme qui modifie la séquence en acides aminés de la préproghréline au niveau de l'exon 3 et ce dernier entraîne une altération de l'ARNm ou de l'épissage de la préprohormone (Ukkola O et al 2011). D'autre part, (rs696217) augmente significativement l'indice de masse corporelle (l'IMC) et a un des RC augmenté avec l'obésité (Takahiro et al 2018). Parmi ces SNPs, 269A > T, une mutation qui provoque le changement de Gln90Leu dans la préproghréline, a été décrite comme étant associée à l'anorexie mentale dans une étude japonaise cas-témoins (Shibata et al 2011) mais ceci reste à confirmer.

(rs4684667) A / T a également montré une association significative avec une déficience cognitive chez les personnes âgées vivant dans la communauté espagnole (Mora et al 2014). D'autres études ont confirmé le rôle du polymorphisme (rs4684677) T / A dans l'influence du syndrome métabolique, du trouble panique, du cancer et des risques de maladie thyroïdienne auto-immune (Steinle et al 2005, Hansson-et al 2013, Pabalan et al 2014, Moniuszko et al 2015, Rong Huang et al 2017).

Nous avons également étudié le (rs3491341) C / T, une mutation missens Arg 51 Gln, qui est associée aux troubles métaboliques tels que le diabète, l'hypertension et l'obésité (Laysa et al 2017).

Le polymorphisme du gène du récepteur de la ghréline le (rs2948694) A/G était nominalement associé à des scores AUDIT plus élevés ( $p = 0,0204$ , modèle récessif) et au tabagisme selon (Suchankova et al 2015). Il était également associé de manière significative à la recherche de la nouveauté du trait de personnalité, telle qu'évaluée à l'aide de l'inventaire du tempérament et du caractère (TCI), chez les sujets humains. (Hansson et al 2012). Le (rs572169) A/G une mutation synonyme Arg 151 Arg associés à un risque d'augmentation des porteurs du risque du cancer du sein (Pabalan et al 2014), le (rs2922126) n'a apporté aucune association avec le risque du cancer du sein. (Xiaowei Sherry Yan et al 2013)

Le tableau en annexe et la figure 27 décrivent d'autres polymorphismes que nous n'avons pas étudiés mais qui sont très intéressants. Ceux que j'ai étudiés particulièrement, et que j'ai entrepris de rechercher dans une banque de biopsies de prostate, sont : rs4684677, rs696217 et rs3491341 pour le gène de la ghréline, le rs2948694, rs572169 et rs2922126 pour le récepteur du gène de la ghréline.

## **VI. Objectifs de la thèse**

L'objectif de la première partie de la thèse est de caractériser l'effet d'un agoniste de la ghréline qui est orexigène plus que somatotrope (le JMV-2894) sur la fonctionnalité des cellules-souches neurales du centre-réflexe de satiété *in vitro* et sur la prise alimentaire spontanée *in vivo*, chez la Souris adulte.

L'objectif général de la deuxième partie de la thèse est l'analyse d'association de type cas-témoin dans la population de l'Est Algérien afin d'évaluer l'impact des polymorphismes de type SNP des gènes de la ghréline *GHRL* (variants rs4684677, rs696217 et rs34911341) et de son récepteur *GHS-R* (variants rs2948694, rs572169 et rs2922126) sur le risque de survenue du cancer de la prostate (CaP). Les objectifs spécifiques consistent à :

- 1) Évaluer les fréquences alléliques, génotypiques et haplotypiques.
- 2) Examiner l'association entre les deux polymorphismes de la ghréline et de son récepteur, ainsi que certaines caractéristiques clinico-pathologiques.
- 3) Evaluer les interactions gène/gène et gène/environnement par la méthode MDR (*Multifactor Dimensionality Reduction*)

Par rapport à l'objectif de la thèse, l'utilisation de ghréline pour stimuler l'appétit chez les patients cancéreux pourrait donc « faire plus de mal que de bien » si la ghréline (ou l'agoniste utilisé) est capable de stimuler la prolifération tumorale. Pour tester cette hypothèse, nous avons rajoutés une double approche :

- Caractériser l'effet de la ghréline sur un autre type de cellules-souches non-neural : celles de l'épithélium de prostate, qui par ailleurs sont bien établies comme la source et la cause du CaP chez les mammifères mâles.
- Rechercher l'existence de variants génétiques des gènes de la ghréline et de son récepteur dans une banque de sang (individus sains ou cancéreux) réalisé par ma directrice de thèse, Pr Hajira Berredjem, en collaboration avec Dr. Omar Djeflal, uro-chirurgien à Annaba (Algérie).

# **Matériel et méthodes**

## **PREMIERE PARTIE**

L'objectif de cette première partie est de caractériser l'effet de la ghréline sur la fonctionnalité des cellules-souches neurales du centre-réflexe de satiété.

### **I- Agonistes de ghréline et agents pharmacologiques**

L'agoniste de ghréline JMV-2894 a été synthétisé et fourni gracieusement par Dr Jean-Alain Fehrentz (Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR5247 CNRS-ENSCM-Université de Montpellier). C'est un analogue des ligands peptidiques du récepteur GHSR1a, dont la molécule est un 1,2,4-triazole (Demange et al 2007). Le JMV-2894 a pour masse moléculaire 746 ; il est soluble dans l'eau distillée.

La ghréline (forme octanoylée native de Rat) a été achetée chez Polypeptides (Strasbourg, n°SC1356). Ce peptide est également soluble dans l'eau distillée.

Ghréline et JMV-2894, reçus sous forme de poudre lyophilisée, ont été dissous dans l'eau :

- Soit à la concentration initiale de  $10^{-3}$  M et stocké en aliquots congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ , pour les expériences de cultures cellulaires *in vitro* (II) ;
- Soit à la concentration de  $1,05 \cdot 10^{-4}$  M, soit 320  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids corporel à injecter sous un volume de 100  $\mu\text{L}$ , pour les expériences *in vivo* (IV) selon Bresciani et al 2017.

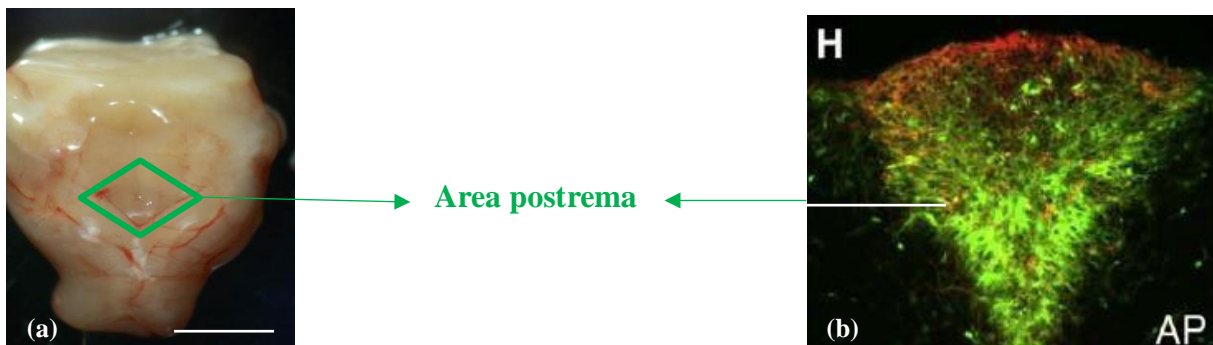
Pour l'étude *in vivo* de l'effet de la ghréline et du JMV-2894 sur le comportement alimentaire et le poids corporel, parallèlement aux traitements pharmacologiques proprement dits, les souris expérimentales ont reçu une administration récurrente de bromodésoxyuridine (BrdU, précurseur de biosynthèse d'ADN, Sigma-Aldrich, n°B-5002) dans l'eau de boisson afin de mesurer post-mortem le taux de prolifération neurogène dans l'area postrema de ces animaux (IV). La solution buvable de BrdU, à la concentration de 2,5mg/mL, a été préparée chaque jour ex-temporément, en dissolvant 1g de BrdU dans 5 mL d'eau préchauffée à  $37^{\circ}\text{C}$  additionnée de 1 mL de NaOH à 0,1N, puis en diluant cette pré-solution avec 194 mL d'eau - selon le nombre d'animaux à traiter simultanément.

## II- Culture primaire de cellules-souches neurales d'AP de Souris

### 1- Animaux et prélèvements tissulaires

Nous avons utilisé des souris C57Bl/6J mâles adultes âgées de 6 à 8 semaines.

Après euthanasie par décapitation sous anesthésie générale, l'encéphale entier est prélevé et débarrassé des méninges. La partie postérieure du cerveau est isolée par une coupe transversale au scalpel à l'avant du cervelet, débarrassée du cervelet en sectionnant les pédoncules cérébelleux, posée sur sa face ventrale et transférée sous loupe binoculaire (Leitz). Puis 4 incisions verticales de 1mm sont pratiquées sur le plancher du ventricule IV autour de l'area postrema qui est excisée ensuite sous forme de cube à la verticale du périmètre en vert ci-dessous (Figure 28) avec une pince fine courbe. Les instruments utilisés sont soit stériles à usage unique (lames de scalpel), soit stérilisés extemporanément par immersions dans l'éthanol 70° puis dans l'eau distillée.



**Figure 28.** (a) : Face dorsale du tronc cérébral sous loupe binoculaire [barre d'échelle, 1mm] ; (b) : Coupe transversale du tronc cérébral en histofluorescence des cellules nestine-positives de souris transgéniques, face dorsale en haut, centrée sur l'AP [b, reproduite de Bennett et al 2009].

### 2- Dissociation cellulaire et mise en culture

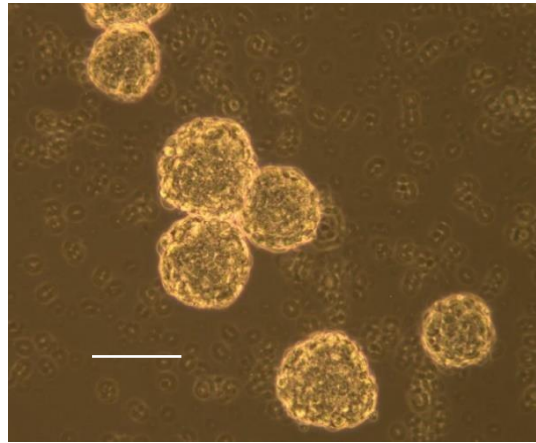
Chaque fragment tissulaire obtenu est immédiatement plongé dans un tube Eppendorf stérile contenant 500µl d'enzyme accutase (Gibco-Invitrogen, n°A1110501) non diluée, préchauffée à 37°C, qui a pour rôle de dissocier le tissu sans l'endommager. Après 15 minutes d'incubation dans l'étuve à 37°C, la réaction est arrêtée par ajout de 800µl de milieu Dulbecco's Minimum Eagle's Medium (DMEM) simple, puis le contenu total est transféré à la pipette P1000 dans un tube Falcon de 15ml qui est centrifugé à 400xg pendant 8 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans 1ml de milieu de culture (NSC+GFs) préchauffé à 37°C : DMEM/F12/Glutamax (Gibco Invitrogen n°31331-028), supplément B27 (Gibco Invitrogen n°17504-044) à 1x, antibiotiques pénicilline et streptomycine (Gibco Invitrogen n°15140-122) à la dilution préconisée par le fournisseur,

tampon HEPES (Gibco Invitrogen n°15630-056) à 0,015M et pH 7.6, EGF (Gibco Invitrogen n°53003-018) à 40ng/mL, bFGF (Gibco Invitrogen n°13256-029) à 20ng/ml. Puis une dissociation mécanique est réalisée par 20 allers-retours dans une seringue stérile de 1mL munie d'une aiguille 21G neuve. La densité cellulaire est déterminée dans une cellule de Malassez sur un échantillon de 20µl de suspension cellulaire dilué avec 20µl de Bleu de trypan (qui colore en bleu les cellules mortes) ; le volume de suspension cellulaire est ajusté pour une densité finale de 30.000 cellules/ml. Cette suspension est ensemencée dans une plaque de culture 24-puits stérile (Greiner-CellStar, for non-adherent cells, n°662160) en présence ou en absence de l'agoniste ghrélinergique et/ou de l'agent pharmacologique étudiés (Tableau 3). Les solutions 10x pour les expériences de dose-réponse sont réalisées extemporanément par une cascade de dilutions à partir d'une solution stock (par exemple JMV-2894 à 10<sup>-3</sup>M).

**Tableau 3.** Ensemencement des cellules dans une plaque de culture 24 puits.

<b>Puits</b>	<b>Condition contrôle</b>	<b>Conditions traitées</b>
<b>Suspension cellulaire</b>	900 µL	900 µL
<b>Milieu de culture NSC+GFs</b>	100 µL	-
<b>Agent pharmacologique (dilution 10x)</b>	-	100 µL
<b>Volume total par puits</b>	1 mL	1 Ml

La plaque de culture cellulaire est placée dans l'étuve à 37°C et atmosphère à 5%CO<sub>2</sub>/2%O<sub>2</sub> et surveillée quotidiennement au microscope inversé. Dans ces conditions, la plupart des cellules neurales différenciées meurent dans les deux premiers jours. Si des cellules-souches neurales étaient présentes dans le bloc tissulaire initial, il apparaît des massifs sphériques qui grossissent au fil des jours : des neurosphères, dérivant chacune de la prolifération d'une cellule-souche.



**Figure 29.** Culture de neurosphères d'AP (2<sup>ème</sup> génération, 7 DIV après 1<sup>er</sup> passage). Barre d'échelle : 80µm.

Dès que les neurosphères arrivent à maturité (Figure 29), et avant que leur centre devienne dense et sombre, habituellement après 7-8 jours de culture (« days *in vitro* » ou DIV), un passage est effectué en collectant les contenus des puits de chaque condition de culture dans des tubes Falcon de 15 mL et en centrifugeant celui-ci 8 min à 400xg. Après élimination du surnageant, le culot de neurosphères est resuspendu dans 1 mL de milieu NSC+GF neuf par 15 aller-retours en seringue stérile équipée d'une aiguille 23G. Après numération des cellules dissociées sur lame de Malassez (cf plus haut) et ajout du volume requis pour une densité de 30.000 cellules/mL, la suspension est réensemencée sur une nouvelle plaque dans les mêmes conditions qu'avant le passage, pour une génération suivante.

### **III- Culture primaire de cellules-souches de prostate de Souris**

#### **1- Animaux et prélèvements tissulaires**

Nous avons utilisé des souris C57Bl/6J mâles adultes âgées de 6 à 8 semaines. Après euthanasie par inhalation de CO<sub>2</sub> pendant 10 minutes, la souris est allongée sur sa face dorsale et la cavité abdominale ouverte par la face ventrale, puis transférée sous loupe binoculaire (Zeiss). Le tractus intestinal est déplacé latéralement pour dégager l'appareil uro-génital, les différents lobes de la prostate sont détachés de la vessie et des vésicules séminales avec des ciseaux fins et des pinces stériles, et transférés dans une boîte de Pétri contenant du milieu de Dulbecco modifié par Eagle (DMEM, Gibco-Invitrogen) stérile.

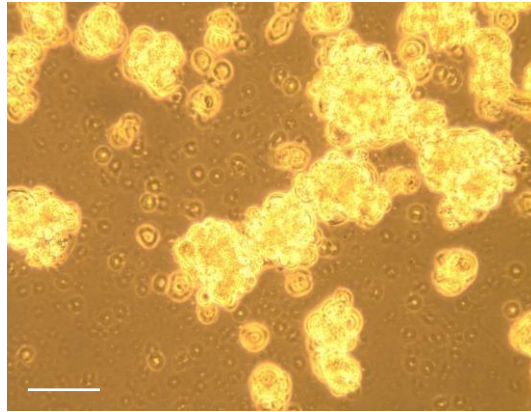
#### **2- Dissociation cellulaire et mise en culture**

Selon les protocoles de culture primaire de cellules-souches d'épithélium prostatique de la littérature (Bahmed et al 2018), sous hotte de culture cellulaire (à flux laminaire stérile), les

fragments de prostate sont rapidement débarrassés du tissu adipeux et de l'urètre, puis découpés grossièrement en petits morceaux et transférés dans un tube de 3mL de solution de collagénase-type-II (Gibco-Invitrogen) stérile à 5mg/mL (préparée ex-temporaneamente et pré-chauffée à 37°C) pour incubation 1h30 à 37°C. Ce tube est alors centrifugé 5 minutes à 300g, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 2mL de solution commerciale de Trypsin-EDTA à 0,05% (Sigma-Aldrich, ref T3924) pré-chauffée à 37°C. Après 5 minutes d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par ajout de 2mL de DMEM frais, et le tube est centrifugé 5 minutes à 300g. Le surnageant est éliminé, et le culot est resuspendu dans 1mL de milieu de croissance cellulaire pour épithélium de prostate (PrEGM medium and bullet-kit, Lonza, Belgique ; refs CC-3101 et CC-4131) supplémenté avec glutamax (Gibco Invitrogen n°31331-028), supplément B27 (Gibco Invitrogen n°17504-044) à 1x, antibiotiques pénicilline et streptomycine (Gibco Invitrogen n°15140-122) à la dilution préconisée par le fournisseur, tampon HEPES (Gibco Invitrogen n°15630-056) à 0,015M et pH 7.6, EGF (Gibco Invitrogen n°53003-018) à 20ng/mL, bFGF (Gibco Invitrogen n°13256-029) à 20ng/ml (« PrEGM + GF »). Puis une dissociation mécanique est réalisée par 20 aller-retours dans une seringue stérile de 1mL munie d'une aiguille 21G neuve. La densité cellulaire est déterminée dans une cellule de Malassez sur un échantillon de 20µl de suspension cellulaire dilué avec 20µl de Bleu de trypan (qui colore en bleu les cellules mortes) ; le volume de suspension cellulaire est ajusté pour une densité finale de 30.000 cellules/ml. Cette suspension estensemencée dans une plaque de culture 24-puits stérile (Greiner-CellStar, for non-adherent cells, n°662160) en présence ou en absence de l'agoniste ghrélinergique et/ou de l'agent pharmacologique étudiés (**Tableau 3**). Les solutions 10x pour les expériences de dose-réponse sont réalisées extemporaneamente par une cascade de dilutions à partir d'une solution stock (par exemple JMV-2894 à 10<sup>-3</sup>M).

La plaque de culture cellulaire est placée dans l'étuve à 37°C et atmosphère à 5%CO<sub>2</sub>/2%O<sub>2</sub> et surveillée quotidiennement au microscope inversé. Dans ces conditions, il apparaît des massifs sphériques de forme irrégulière qui grossissent au fil des jours : des « prostatosphères » (Bahmed et al 2018).

Dès que les prostasphères arrivent à maturité (Figure 30), habituellement après 7-8 jours de culture, un passage est effectué en collectant les contenus des puits de chaque condition de



**Figure 30.** Culture de prostasphères de Souris (2<sup>ème</sup> génération, 7 DIV après 1<sup>er</sup> passage).

Barre d'échelle : 80µm.

culture dans des tubes Falcon de 15 mL et en centrifugeant celui-ci 8 min à 400xg. Après élimination du surnageant, le culot de prosta-sphères est resuspendu dans 1 mL de milieu PrEGM+GF neuf par 15 aller-retours en seringue stérile équipée d'une aiguille 23G. Après numération des cellules dissociées sur lame de Malassez (cf plus haut) et ajout du volume requis pour une densité de 30.000 cellules/mL, la suspension est réensemencée sur une nouvelle plaque dans les mêmes conditions qu'avant le passage, pour une génération suivante.

#### **IV- RT-qPCR**

La RT-qPCR consiste à détecter un ARN de séquence nucléotidique connue à l'intérieur d'un extrait d'ARN cellulaire brut, par une amplification spécifique de son ADN complémentaire rétro-synthétisé par une reverse-transcriptase à partir des ARN initiaux.

##### **1- Extraction d'ARN**

Les blocs tissulaires ou les culots de cellules cultivées sont lysés par l'ajout de 0,5 mL de TRIzol sur glace, et incubation de 5 minutes à température ambiante. Après la lyse, les ARNs totaux sont isolés par l'ajout de 0,1 mL de chloroforme en mélangeant par inversion, pour incubation 3 minutes à température ambiante. Après centrifugation à 12000 g pendant 15 min à 4°C, la phase aqueuse est prélevée à la pipette munie de cône à filtre stérile, et transférée dans un nouveau tube Eppendorf stérile, puis les ARNs de la phase aqueuse sont précipités après l'addition d'un équivalent d'isopropanol. Après incubation à température ambiante pendant 10 min puis centrifugation à 12000 xg pendant 15min à 4°C, le surnageant est

éliminé à la pipette et le culot est séché à l'air libre 5 à 10 min. Ce culot est ensuite resuspendu dans un volume de 15µl d'eau stérile RNase-free. L'ensemble de la procédure est réalisé sous hotte aspirante et la quantification des échantillons d'ARN est estimée par la mesure de la DO à 240 et 260 nm par un micro-spectrophotomètre (NanoDrop).

## **2- Reverse transcription**

Suivant le protocole du Kit RT-SuperScript-II (Invitrogen), la reverse transcription est réalisée dans un milieu contenant les désoxyribonucléotides dNTPs 10 mM, des oligonucléotides-amorces aléatoires (oligo-dt) à 0,5 µg /µl, le tampon réactionnel (fourni en concentré 5X), du dithiothréitol (DTT) 0,1 M, l'inhibiteur RNAase-out (dilué 1/20) et le volume d'eau distillée RNA-free pour ajuster au volume réactionnel final (ci-dessous). Tous ces ingrédients sont combinés dans un premier temps dans un « mix ».

Pour un volume réactionnel de 20µL, chaque tube réactionnel contient 9 µL du mix ci-dessus et reçoit le volume d'échantillon ARN correspondant à 4 µg, complété à 10 µL par de l'eau distillée stérile. Dans un tube destiné au contrôle négatif de PCR (« blanc »), l'échantillon ARN est remplacé par de l'eau distillée.

Tous les tubes sont incubés à 65°C pendant 5 min, pour dénaturation des oligonucléotides et séparation des brins d'ARN. Puis chaque tube reçoit 1µl de reverse transcriptase SuperScript II, sauf un tube destiné à contrôler l'absence de contamination des ARN par de l'ADN génomique (noRT) dans lequel l'enzyme est remplacée par 1 µL d'eau distillée.

Tous les tubes sont alors incubés 50 minutes à 42°C. La réaction est terminée en incubant les échantillons à 70°C pendant 15 min puis en les refroidissant 5 min sur glace.

## **3- Amplification d'une séquence-cible par polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)**

### *a- Principe*

La PCR consiste à amplifier une séquence précise d'ADN, dont les extrémités sont marquées par deux amorces oligonucléotidiques, en un grand nombre de copies identiques (amplicons), grâce à une ADN-polymérase (Taq-polymérase) résistante à une température assez élevée (94°C) pour permettre la dés-hybridation de brins d'ADN anti-parallèles. En effectuant plusieurs cycles successifs de polymérisation-dés-hybridation, les copies de la séquence encadrée servent à leur tour de matrices pour la Taq-polymérase au cycle suivant, ce qui rend exponentielle l'augmentation des copies au cours des cycles successifs.

La qPCR est une variante de PCR utilisant des nucléotides fluorescents, ce qui permet de suivre l'amplification en temps réel par fluorométrie dans un thermocycler approprié.

***b- Protocole***

Dans les puits d'une plaque 96-puits pour qPCR, 2µl de chaque ADNc obtenu par reverse transcription (et prédilué à 1/5 dans l'eau distillée) sont distribués en présence de 4µl du mélange d'amorces encadrant la séquence d'intérêt (sens et anti-sens, 10µM chacune) et de 10 µl du mix commercial de Taq DNA-polymerase avec les désoxyribonucléotides fluorescents (réactif SYBR-Green, Biorad) complété qsp avec le volume d'eau distillée stérile pour un volume réactionnel de 20 µL. De plus, une série de puits de la même plaque reçoit une gamme-étalon constituée d'une série de dilutions en cascade de l'un des ADNc de la série étudiée (1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125), afin de déterminer l'efficacité de la réaction de qPCR.

La plaque est alors placée dans le thermocycler en temps réel (BioRad CFX96) et ajustée à un programme standardisé avec une étape initiale de dénaturation, 10 minutes à 94°C, suivie de 40 cycles comportant chacun : i) dénaturation 30 secondes à 94°C, ii) hybridation 30 secondes au Tm moyen des deux amorces utilisées, iii) polymérisation des amplicons (« élévation ») 30 secondes à 62°C. La courbe d'amplification de chaque échantillon est caractérisée par le nombre de cycles requis pour le début de la sigmoïde, ou « Ct », qui est mesuré automatiquement par le logiciel du thermocycler.

Les amorces utilisées pour les différents gènes analysés sont décrites dans le tableau 4, avec leurs températures d'hybridation.

**Tableau 4.** Séquences des amorces utilisées.

ARNm	Amorces (sens [F] et anti-sens [R])	Tm en °C
Beta-actine (Kastner et al 2000)	F : 5'TTGCTGATCCACATCTGCTG-3' R : 5'-GACAGGATGCAGAAGGAGAT-3'	62°C
GHSR-1a (Ku et al 2015)	F : 5'-GCTGCTCACCGTTGATGGTAT-3' R : 5'-ACCACAGCAAGCATCTTCACT-3'	60,5°C
Cycline D1 (Kastner et al 2000)	F : 5'-TCTACACTGACAACTCTATCCG-3' R : 5'-TAGCAGGAGAGGAAGTTGTTGG-3'	63°C

## **V- Analyse *in vivo* du comportement alimentaire de Souris**

Cette analyse a été réalisée dans l'animalerie de l'Institut de Psychiatrie et Neurosciences (UMR-1266 INSERM, Paris), sous la direction de Dr Virginie Tolle, en utilisant des souris C57Bl/6J mâles âgées de 7 semaines au début des expériences (fournisseur Charles River, France).

### **1- Utilisation des cages métaboliques**

Les Souris, quelques jours après leur arrivée à l'animalerie en hébergement standard (5 animaux par cage), ont été transférées dans une série de cages métaboliques à raison de 1 par cage. Chacune de ces cages métaboliques (TSE LabMaster Systems) est équipée de détecteurs électroniques dans les distributeurs de croquettes nutritives et d'eau de boisson, qui sont munis de dispositifs anti-pertes, et de détecteurs de mouvements (cellules photoélectriques). Ces détecteurs sont reliés à un ordinateur chargé d'un logiciel permettant la mesure de prise alimentaire, de prise hydrique, et d'activité locomotrice 24 heures sur 24, avec une fréquence fixée par l'expérimentateur. Les souris ont séjourné dans ces cages pendant 4 semaines, dont 1 semaine initiale d'habituation en conditions standard, puis 3 semaines de traitements pharmacologiques (cf plus loin, §2). Le poids corporel de chacune des souris expérimentales a été mesuré quotidiennement (entre 14h et 16h) par pesée sur une balance de l'animalerie.

### **2- Protocole expérimental *in vivo***

Après 1 semaine d'habituation aux cages métaboliques, les souris ont été réparties en 4 groupes expérimentaux (N=4) recevant chacune 1 injection sous-cutanée par jour, l'après-midi (15h-17h), pendant 3 semaines :

- Soit de JMV-2894 à raison de 320 mg/kg de poids corporel (Bresciani et al 2017),
- Soit de ghréline acylée à la même dose,
- Soit de solution de NaCl à 0,9% (contrôle, 2 groupes).

Le nombre limité des cages disponibles (8) a imposé de répartir ces groupes en 2 cohortes successives, et donc de comparer l'effet de chacun des ligands ghrélinergiques avec un groupe contrôle respectif.

Pendant la première semaine de traitement, les souris ont reçu en plus l'administration de BrdU avec l'eau de boisson, dans le but de marquer la neurogenèse cérébrale (cf I).

Toutes les souris ont été euthanasiées le lendemain du dernier jour de traitement pharmacologique, par perfusion sous anesthésie générale (au pentobarbital sodique) d'une

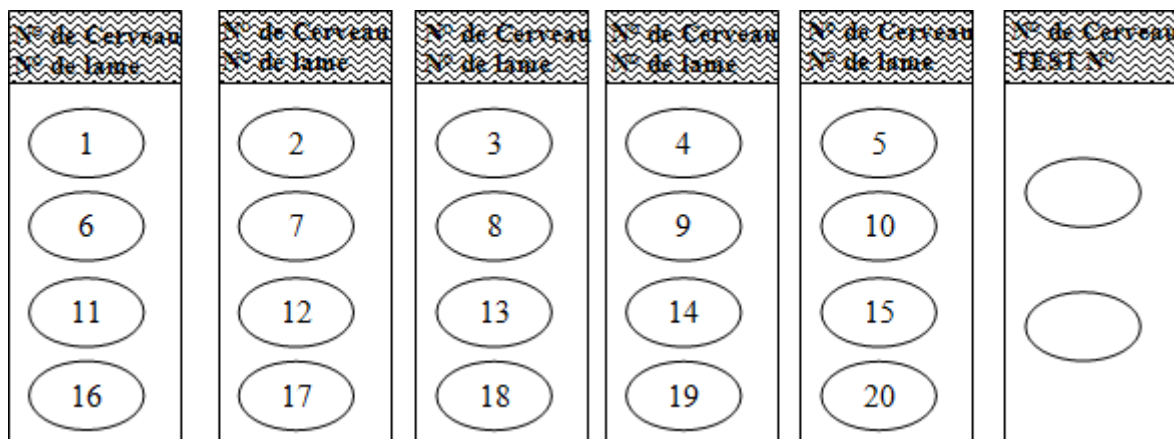
solution tamponnée de paraformaldéhyde à 4% pendant 10 minutes. Les cerveaux ont été prélevés, post-fixés 1 heure à 4°C dans la solution de paraformaldéhyde, puis cryoprotégés par immersion 24h à 4°C dans une solution tamponnée de saccharose à 30%, congelés par immersion 20 secondes dans l'isopentane à -45°C et stockage à -80°C.

## **VI- Immunohistochimie du BrdU incorporé *in vivo***

### **1- Réalisation des coupes sériées d'AP au cryostat**

Les coupes sériées de cerveaux congelés ont été réalisées avec un cryostat CM3050S (Leica). Pour cela, chaque cerveau est placé dans l'enceinte à -25°C et fixé sur une platine porte-objet à l'aide d'un milieu d'enrobage (Tissutek, Leica microsystemes, France), extrémité postérieure du cerveau vers le haut. Les coupes transversales de 14 µm d'épaisseur sont réalisées une à une à l'aide d'un rasoir à lames jetables dont la température de coupe est ajustée à -25°C.

De l'arrière vers l'avant du complexe vagal (identifié par des repères macroscopiques), toutes les sections sont collectées l'une après l'autre sur des lames polysialylées Superfrost-Plus (Thermo-Scientific-Fisher, Menzel-Gläser) par séries de 5 lames adjacentes dont chacune porte plusieurs coupes qui sont i) quasi-identiques de lame à lame, ii) régulièrement espacées de 70 µm les unes des autres (Figure 31).



**Figure 31.** Protocole de collecte des sections transversales sériées de cerveau postérieur, par séries de 5 lames numérotées de [1+i] à [5+i]. Chaque section est représentée par un ovale, et les numéros sont ceux de l'ordre chronologique de réalisation/prélèvement sur le rasoir.

Les lames restent à l'intérieur de l'enceinte du cryostat, posées à plat, tant que dure la collecte de toutes les sections remplissant la surface des 5 lames d'une même série. Ceci ne doit pas excéder 15-20 minutes, pour éviter le dessèchement des sections. Le « montage » des sections

sur chaque lame est fait par décongélation progressive en une seule fois, par contact prolongé d'un doigt sur la face de la lame opposée aux sections. La numérotation des lames-supports est faite suivant l'ordre chronologique de réalisation des sections à partir de l'arrière. Après séchage à l'air ambiant (1-2 heures), les lames sont stockées en boîte étanche à -20°C.

## **2- Immunohistochimie BrdU**

Les lames sont sorties du congélateur et séchées à l'air libre sur la paillasse pendant 30 min, hydratées dans un bain de tampon phosphate-salin (« PBS » : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaCl 0,1M pH 7.4) pendant 5 min à température ambiante, puis perméabilisées dans une solution de Triton X-100 à 0,5% dans le PBS 30 minutes à température ambiante, et rincées dans le PBS pendant 5min. Ensuite, elles sont traitées dans HCl 0.1N à 4°C pendant 30 min puis dans HCl 2N à 40°C pendant 45 min. Après neutralisation dans le tampon Na-métaborate 0.1M à pH 8,5 pendant 10 min à température ambiante et rinçage dans le PBS, les sections sont pré-incubées dans le tampon de blocage (PBS / 0,1% Triton X-100 / 0,5% serum-albumine bovine [BSA] / 5% sérum normal d'Ane [NDS]) 30 min à température ambiante, puis incubées avec l'anticorps primaire anti-BrdU (monoclonal de rat anti-BrdU, OBT0030, clone BU 1/75) dilué 1/100 dans le milieu de pré-incubation (tampon de blocage) 2h à température ambiante, puis 12-16h à 4°C. Préincubation et incubation sont réalisées en déposant une goutte de 100µL sur chaque section, les lames étant placées horizontalement en chambre humide (« incubation en goutte »).

Après rinçages des lames en 3 bains successifs de PBS à température ambiante (3 x 10min), les lames sont replacées en chambre humide pour incubation en goutte avec l'anticorps secondaire d'Ane anti-IgG de Rat, marqué au fluorophore Alexa-Fluor-594 (Molecular Probes), dilué au 1/400 dans le tampon PBS / 0,5% BSA / 2% NDS, pour 2 heures à température ambiante et à l'obscurité. Après 3 rinçages en PBS, les lames sont montées sous lamelle avec une goutte de milieu de montage pour fluorescence (FluoPrep, Dako) et stockées à 4°C et à l'obscurité jusqu'à l'observation en microscopie à fluorescence.

## **DEUXIEME PARTIE**

L'objectif général de cette deuxième partie de la thèse est l'analyse d'association de type cas-témoin dans la population de l'Est Algérien afin d'évaluer l'impact des polymorphismes des gènes de la ghréline et de son récepteur sur le risque de survenue du cancer de la prostate.

### **1. Populations et collecte des données**

Cette étude prospective, monocentrique, de type cas-témoins a été réalisée pendant la période 2017 - 2019 et a concerné 215 individus. Le groupe des malades est constitué de 120 patients présentant un CaP sporadique histologiquement confirmé et diagnostiqué à différents grades de sévérité ; les patients étaient âgés entre 51 et 94 ans. L'ensemble des données clinico-pathologiques et anthropométriques extraites des dossiers cliniques, a été recueilli par le médecin traitant. Le groupe des témoins est composé de 95 individus volontaires, d'âge compris entre 29 et 82 ans.

A partir des dossiers cliniques des patients, nous avons relevé les paramètres suivants : l'âge, le taux de PSA, le score de Gleason, le diagnostic pathologique, l'indice de masse corporelle (IMC).

Les critères d'exclusion s'appliquant aux malades comprenaient toutes histoires antérieures de cancers. Les témoins et les malades devaient également être exempts de toutes autres formes de cancers.

### **2. Confidentialité et considérations éthiques**

Le protocole de la présente étude a été approuvé par le Comité d'éthique de l'Université Badji Mokhtar d'Annaba (UBMA) (numéro CEDUBMA-02-12/21) et a été mené conformément à la déclaration d'Helsinki. Tous les participants à cette étude ont donné leur consentement éclairé.

Afin de garantir le respect de la vie privée et la confidentialité des données, un numéro identificateur confidentiel a été attribué aux sujets.

### **3. Extraction d'ADN**

L'ADN génomique des leucocytes a été extrait à partir de 10 mL de sang total prélevé sur EDTA à l'aide du kit FlexiGene®DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany) selon les recommandations du fabricant. La concentration d'ADN dans chaque échantillon a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop™1000 (Thermo Fisher Scientific, États-

Unis). La concentration de l'ADN est déterminée par la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm. Un rapport d'absorbance à A260/A280 de 1,8 - 2,1 confirme la pureté de l'ADN. Enfin, l'ADN pur est dissout dans le tampon TE 10/1 (Tris/HCl 10mM; EDTA 1mM; pH = 8.0), puis conservé à -20°C.

#### **4. Génotypage SNP TaqMan®**

- ***Principe***

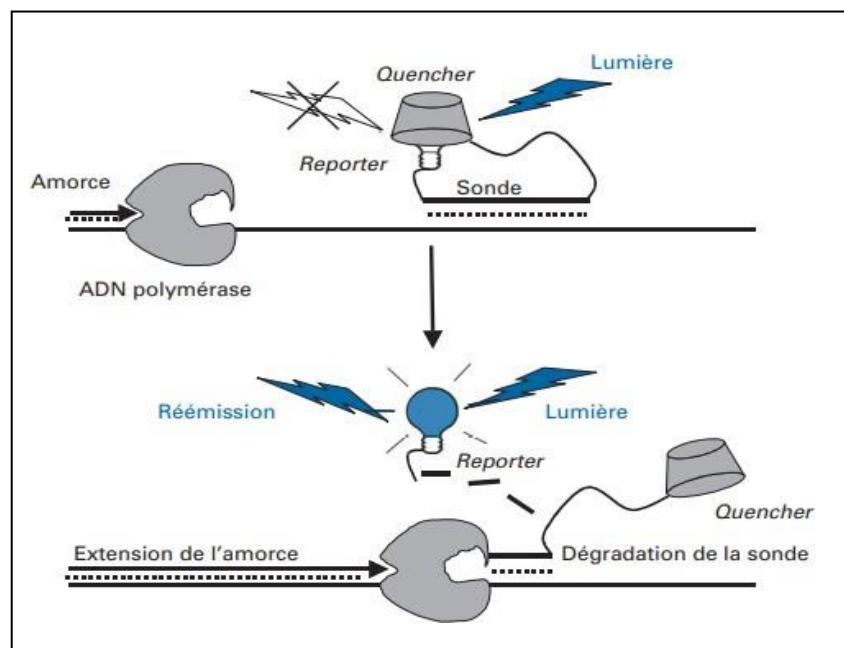
Décrite en 1985 par Karry Mullis et ses collaborateurs, la PCR a révolutionné les méthodes d'analyse moléculaire. Cette méthode enzymatique, très efficace pour l'amplification *in vitro* de l'ADN selon un mode exponentiel, utilise une ADN polymérase thermorésistante (Taq polymérase), qui agit par extension de deux amorces spécifiques encadrant la séquence à amplifier. Cette technique repose sur la répétition de trois phases :

1. Dénaturation : le tube est chauffé quelques secondes à 94-95°C. Les double-brins d'ADN se séparent et l'ADN est dénaturé.
2. Hybridation : la température est rapidement abaissée à 55°C (généralement  $T_m - 5^\circ\text{C}$  en fonction du tampon et de la stringence nécessaire à la spécificité du produit). Les amorces s'hybrident chacune sur son brin respectif. Cette étape dure généralement 30 secondes.
3. Élongation : la température du tube est ensuite augmentée à 72°C, ce qui permet à la Taq polymérase d'ajouter des nucléotides aux amorces hybridées, dans le sens 5' → 3'. Cette étape est basée sur le principe de complémentarité des bases nucléiques et dure une minute par kilobase amplifiée.

La technique de PCR en temps réel (RT-PCR ou qPCR) repose sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent au cours de la réaction. Le signal fluorescent est directement proportionnel à la quantité de produits de PCR générés. En mesurant l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle, il est possible de suivre la formation des produits de PCR pendant la phase exponentielle. Les produits d'amplification peuvent être détectés selon deux grands principes : par marquage non spécifique avec des agents se liant à l'ADN double brin (Sybr Green I) et par marquage spécifique à l'aide de sondes fluorescentes (Sondes TaqMan).

Plus généralement, on utilise une méthode de détection spécifique du produit de PCR. Parmi ces processus spécifiques, les sondes TaqMan (Applied Biosystems) sont souvent employées. Dans ce cas, la PCR est réalisée à l'aide de deux amorces oligonucléotidiques encadrant le SNP étudié et une sonde spécifique d'un allèle qui présente un double marquage

avec un fluorochrome quencher situé en 3' et un fluorochrome reporter en 5'. Pour un cycle donné de PCR, après l'étape d'hybridation, la fluorescence émise par le reporter est aussitôt absorbée par le quencher situé non loin de lui et le signal de fluorescence est alors quasi-nul. Plus tard au moment de l'élongation, l'activité 5' > 3' exonucléasique de la Taq polymérase dégrade la sonde spécifique. Le reporter se trouve libéré du quencher qui ne peut plus absorber la fluorescence du reporter : un signal de fluorescence est alors détecté (Figure 32) La fluorescence liée au fluorochrome reporter est proportionnelle à la quantité de molécules de produit de PCR contenant le SNP recherché (Livak et al 1995, Le Morvan et al 2005).



**Figure 32.** Principe du TaqMan (Le Morvan et al 2005).

- **Méthode**

Dans cette étude cas-témoins 215 participants ont été génotypés pour les gènes *GHRL* et *GHS-R* respectivement. Les polymorphismes génétiques SNPs de 3 variants alléliques *GHRL* et 3 variants alléliques *GHS-R* (Tableau 4) ont été analysés par TaqMan.

L'amplification a été réalisée dans un mélange réactionnel de 10 µl contenant 10 ng d'ADN génomique, 1X du tampon de PCR, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de chaque dNTP, 200 µM de chaque amorce et sonde et, une unité (U) de Taq DNA polymérase (Invitrogen). Pour chaque série d'amplification, il est nécessaire de réaliser en parallèle un témoin négatif ne contenant pas d'ADN afin de vérifier l'absence de contamination. L'amplification a été réalisée dans le thermocycler SDS (système de détection de séquences) 7900HT Fast Real-

Time PCR System (Applied Biosystems, France). Les conditions d'amplifications comportent successivement une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 10 minutes, suivie de 40 cycles comprenant chacun une dénaturation à 92°C pendant 15 secondes et, une étape d'hybridation/élongation à 60°C pendant 60 secondes.

Au début de la PCR en temps réel, nous avons trois phases distinctes que l'on peut observer avec la courbe :

- Le bruit de fond = Phase d'initiation : C'est le début de la réaction, il n'y pas assez de produits PCR néo formés pour que cela dépasse la valeur du seuil de détection utilisé.
- La phase exponentielle : C'est le doublement du nombre de produits PCR à chaque cycle, c'est là où nous pouvons détecter la fluorescence émise par notre échantillon.
- La phase de plateau : C'est la dernière phase lorsque les réactifs de la PCR deviennent les limitants de la réaction.

**Tableau 5.** Caractéristiques des SNPs étudiés.

Gene	SNP	Position	Allèle	MAF	Localisation	SNP type	TaqMan SNP
<u><i>GHRL</i></u> 3p25.3	rs4684677	10286769	T>A	0.060	Exon 4	Missense (Gln 90 Leu)	C__25607748_10
	rs696217	10289773	G>T	0.077	Exon 3	Missense (Leu 72 Met)	C__3151003_20
	rs34911341	10289835	C>T	0.007	Exon 3	Missense (Arg 51 Gln)	C__25607739_20
<u><i>GHSR</i></u> 3q26.31	rs2948694	172447373	T/C, G, T	0.110	Intron 1	Intron	C__16174361_10
	rs572169	172447937	C>T	0.295	Exon 1	Silent	C__1079489_20
	rs2922126	172449471	T>A	0.303	2KB upstream variant	5' flanking region/promoter	C__3261006_10

SNP: single nucleotide polymorphism; *GHRL*: pro-ghrelin gene; *GHS-R*: growth hormone secretagogue receptor gene.

## 5. Analyses statistiques des données

La comparaison entre les deux populations des données de mesure, sous forme de moyenne  $\pm$  SD, a été réalisée à l'aide du test du  $\chi^2$  de Pearson. L'association entre les polymorphismes de la ghreline et de son récepteur (*GHRL* et *GHS-R*) et le CaP a été analysée par régression logistique multivariée. Les rapports de côte (RC ou OR: Odds Ratio) ont permis d'estimer les associations génétiques avec le cancer de la prostate avec un intervalle de confiance (IC) fixé à 95%. L'OR est une mesure statistique qui permet d'estimer l'association en comparant les allèles et/ou les génotypes du groupe « patient » et du groupe « témoin ». Un allèle variant protecteur se traduit par un OR compris entre 0 et 1 ; si l'OR est supérieur à 1,

l'allèle variant est prédisposant. L'association est jugée statistiquement significative lorsque l'intervalle de confiance à 95 % de l'OR ne comporte pas la valeur 1. Les résultats sont considérés significatifs lorsque la valeur de la probabilité  $p \leq 0,05$ . La correction de Fisher est appliquée lorsque l'effectif inférieur à 3.

Les équilibres de Hardy-Weinberg (HWE) ont tous été vérifiés. Pour le calcul des fréquences génotypiques et alléliques, des haplotypes ainsi que le déséquilibre de liaison (DL), nous avons utilisé le logiciel Haploview 4.1 (Barrett et al 2005) en accès gratuit à l'adresse :

<https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>

L'analyse de survie a été réalisée à l'aide de la courbe de Kaplan-Meier.

L'analyse de la réduction de la dimensionnalité multifactorielle (MDR) a été réalisée à l'aide du logiciel statistique MDR v3.0.2 (disponible gratuitement à l'adresse : <http://sourceforge.net/projects/mdr>, Computational Genetics Laboratory, University of Pennsylvania, PA, USA) sur la base de l'algorithme de Ritchie et al (2001) et Hahn et al (2003).

La méthode MDR a été conçue pour prédire les effets interactifs gène-gène (épistasie) ou gène-environnement dans des ensembles de données comportant des variables indépendantes catégoriques telles que les SNP, ainsi que des données environnementales qui peuvent être représentées comme des variables catégorielles. Elle consiste à effectuer une validation croisée de 10 fois sur l'ensemble de données divisé en dix parties égales, dont neuf sous-classes servent d'ensembles d'entraînement de base à la validation croisée et un comme test. Le processus est répété dix fois et le modèle d'interaction gène-gène candidat final est sélectionné en fonction de la cohérence maximale de la validation croisée (CVC) et la précision maximale du test équilibré.

Le SPSS a été utilisé pour les tests statistiques, le Prism graph pad pour les illustrations graphiques et le logiciel Python pour le MDR.

Le Test de Tukey est un post hoc test qui il vient après ANOVA, il a été utilisé si les différences sont significatives.

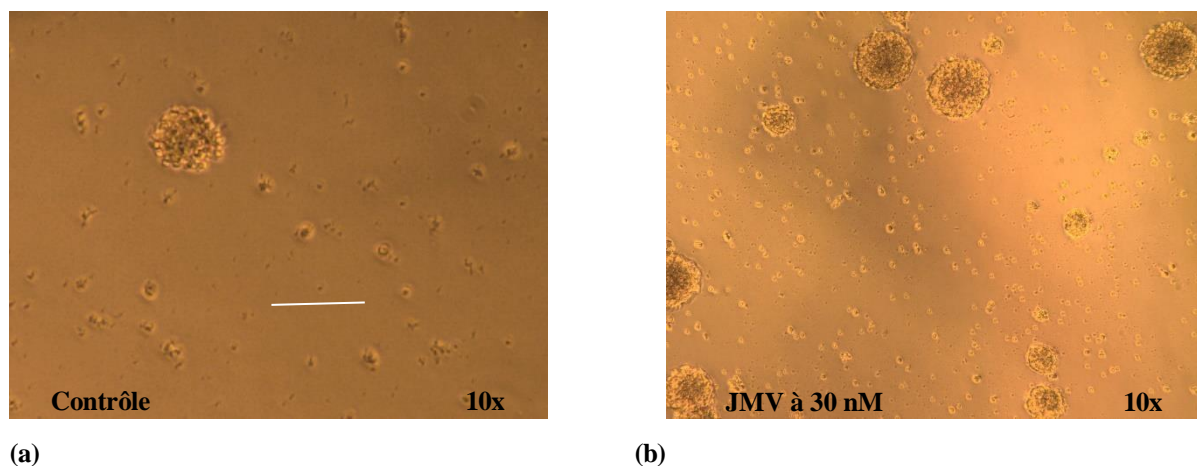
# Résultats

## PREMIERE PARTIE

### 1- Croissance des neurosphères d'area postrema de souris adulte :

La culture primaire de suspension cellulaire obtenue à partir de l'AP de souris adulte a permis d'obtenir en présence des facteurs mitogènes EGF et bFGF la formation de masses sphériques, dites « **neurosphères** » (Bennett et al 2009, Ben Dhaou et al 2023). Lorsque les neurosphères atteignent 100µm de diamètre et, surtout, que leur centre commence à s'opacifier (Louis et al 2013), il est primordial d'effectuer un « passage » c'est-à-dire de les collecter, de les resuspendre dans du milieu de culture frais puis de les réensemencer dans un volume plus grand. Une génération est définie par le laps de temps séparant 2 passages successifs (7-8 jours). Dans la présente étude, les cultures ont été suivies sur 3 générations.

Après chaque passage effectué, de nouvelles sphères identiques aux précédentes se forment, en plus grand nombre qu'à la génération précédente, ce qui démontre la capacité d'**autorenouvellement** des NSCs d'AP (Figure 33).



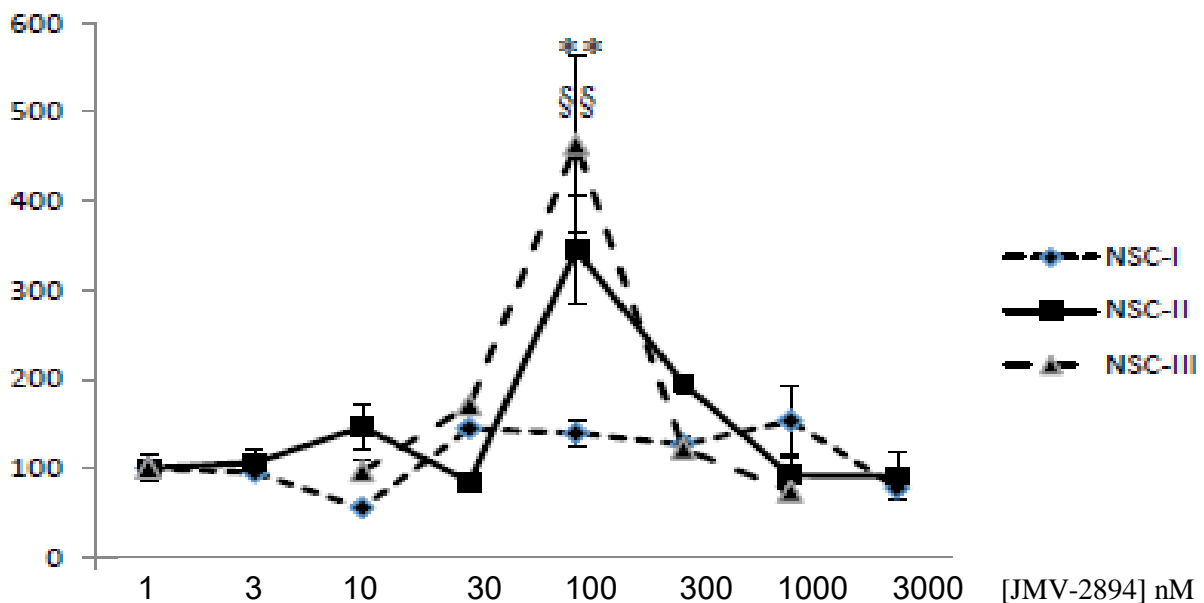
**Figure 33.** Culture de neurosphères III d'AP. (a) : NSC 3<sup>ème</sup> génération, sans JMV-2894, 9 DIV après le 2<sup>ème</sup> passage ; (b) : NSC 3<sup>ème</sup> génération avec JMV-2894, 9 DIV après le 2<sup>ème</sup> passage. Barre d'échelle 100µm.

### 2- Courbe dose-réponse du JMV-2894 sur les neurosphères d'AP de Souris adulte

Des puits de culture de neurosphères d'AP de Souris ont été suivis en absence (contrôles) ou en présence de différentes concentrations de JMV-2894. L'agoniste a été administré lors de la mise en culture, sans renouvellement de milieu jusqu'au passage. Chaque condition de culture (contrôle ou dose donnée de JMV-2894) a été maintenue identique pour la descendance respective de chacun des puits de culture primaire.

A la 1<sup>ère</sup> génération, aucune différence de nombre de neurosphères n'était observable entre les différentes conditions. Une dose-dépendance est apparue par contre à partir de la 2<sup>ème</sup> génération, le nombre de neurosphères culminant à une dose réponse optimale de JMV-2894 qui est égale à 100 nM (Figure 34). L'ensemble de ces courbes dose-réponse montre que, par rapport aux cultures contrôles, le JMV-2894 stimule l'autorenouvellement des NSCs de l'AP selon une cinétique « en cloche » (Figure34).

Nombre de neurosphères/ 3mL



**Figure 34.** Courbe dose réponse du JMV-2894 sur les neurosphères d'AP. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  sem de 3 déterminations. \*\*, §§ : statistiquement significatif à  $p < 0.01$  par Anova one-way suivie de test de Tukey.

### 3- Expression de la cycline D1 par les neurosphères d'AP de souris adulte.

La RT-qPCR de la Cycline D1 (Figure 35) (marqueur d'entrée dans le cycle cellulaire) sur des ARN extraits de culots de neurosphères d'embryons de souris et d'area postrema de souris adulte, indique que les NSCs embryonnaires et les NSCs d'AP sont des cellules prolifératives. Mais l'intensité du signal d'amplification est identique dans les NSCs cultivées avec ou sans JMV-2894, par conséquent l'expression de Cycline D1 (amplicon 93.000 Da, pour 300 nucléotides) n'est pas affectée par le JMV-2894, et ce dans aucun des 2 modèles biologiques.

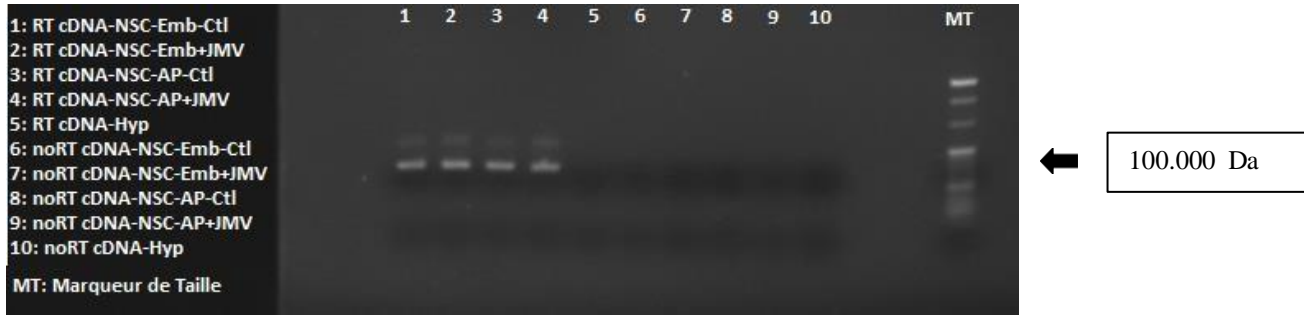
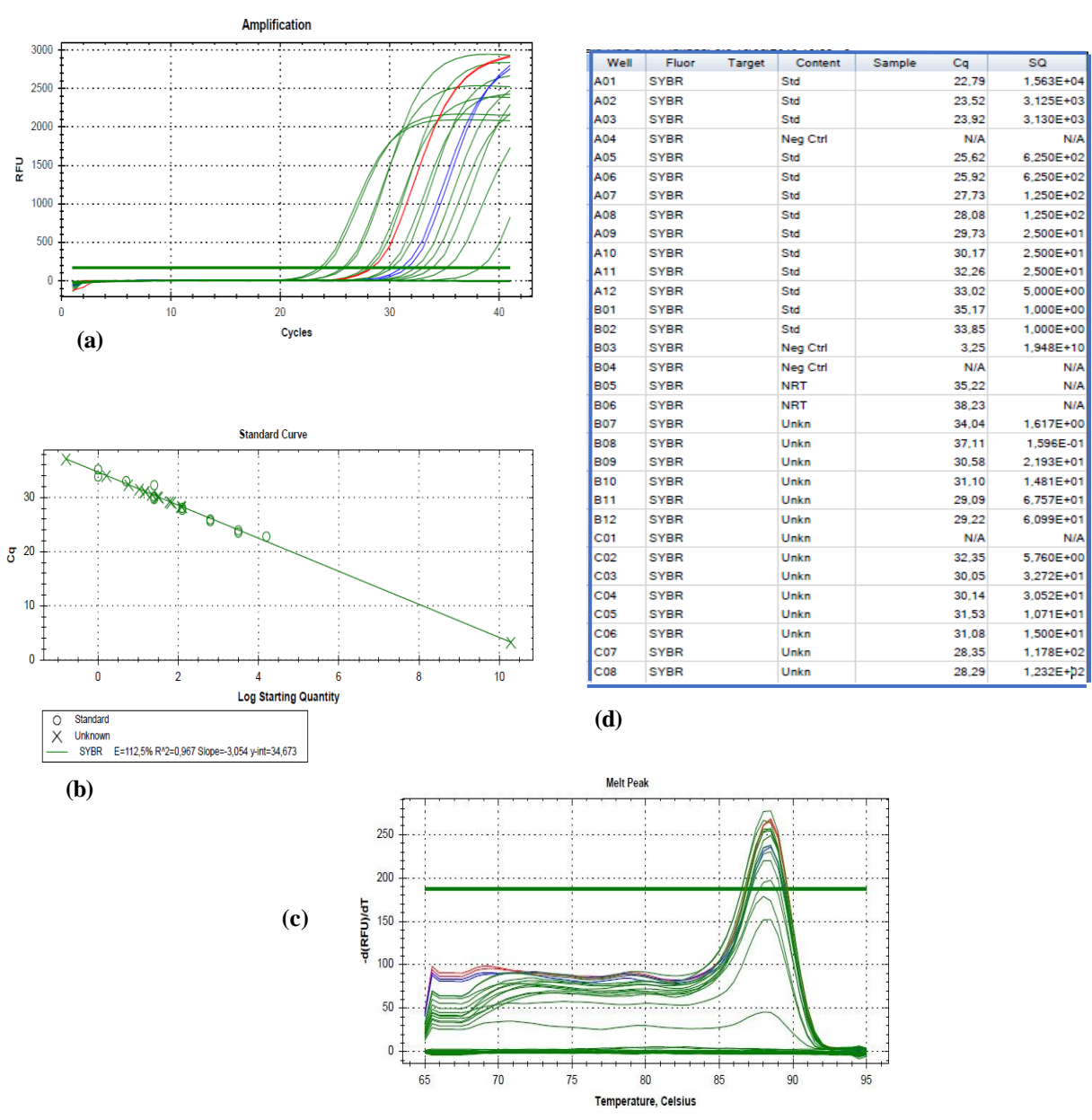


Figure 35. Test PCR de l'expression de la Cycline D1 par les NSCs d'embryon et d'AP de souris adulte.

#### 4- Expression du récepteur de la ghréline GHSR-1a par les neurosphères d'AP de Souris adulte



**Figure 36.** Quantification par RTqPCR de l'expression du GHSR-1a par les neurosphères II d'AP.

(a) : Courbes d'amplification en Sybr-green ; en vert : RT-cDNA d'ARN extraits d'hypophyse de souris adulte aux dilutions successives 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125, 1/15625 et les contrôles négatifs (H2O, noRT) (courbes des standards) ; en bleu : RT-cDNA d'AP sans JMV-2894 dilués à 1/5 (courbes contrôle) ; en rouge : RT-cDNA d'AP traités avec JMV-2894 dilués à 1/5.

(b) : Courbe-étalon tracée par le logiciel du thermocycler.

(c) : Courbe de fusion. (d) : Liste des Ct fournie par le thermocycler.

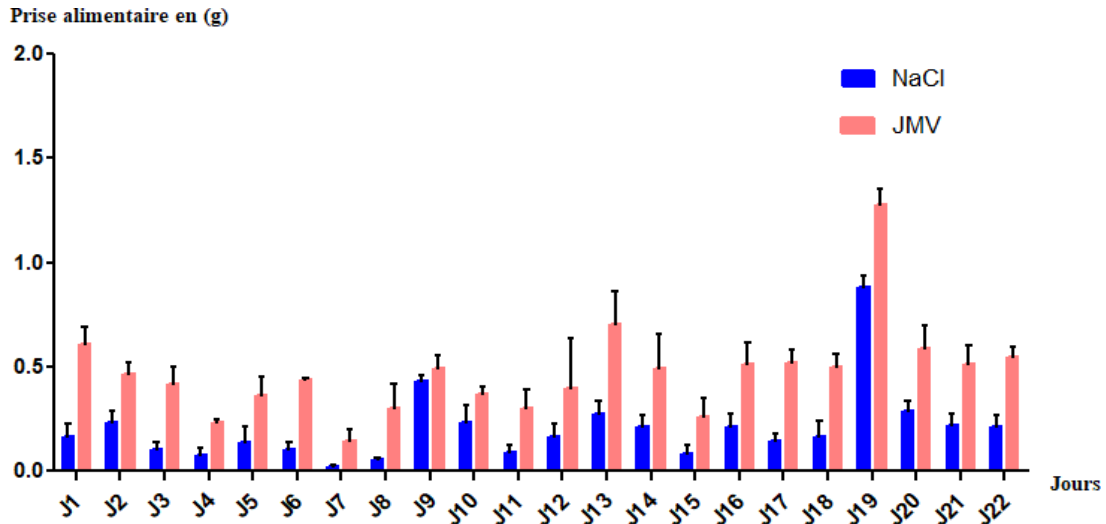
La réalisation d'une PCR en temps réel (qPCR) sur des neurosphères II d'AP de souris adulte, a permis de détecter une forte expression du récepteur GHSR-1a au niveau des cellules de neurosphères d'AP (Figure 36). Après normalisation des Ct de la RTqPCR de GHSR-1a dans les neurosphères d'AP contrôles et les neurosphères d'AP traitées avec JMV-2894, par rapport aux Ct de RTqPCR du gène de ménage GAPDH des mêmes échantillons (Tableau 6), il n'apparaît aucune différence d'expression du GHSR-1a avec ou sans traitement des neurosphères par JMV-2894.

**Tableau 6.** Résultats de normalisation des données de la PCR en temps réel.

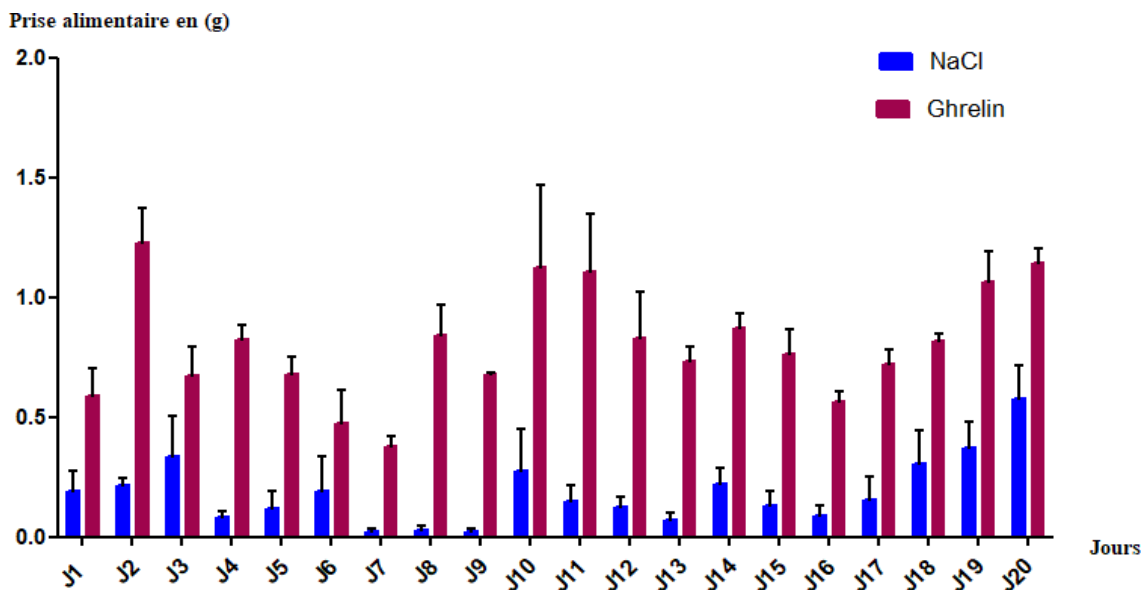
ID du rat	Ratios	GHSR1a	Ct	Moyenne	Écart entre duplicata (%)	SD	GAPDH	Ct	Moyenne	Écart entre duplicata (%)	SD
NSC-AP-Ct 1/5	1,00		32,35	32,35				22,36	22,57	-99,09	0,29
NSC-AP-Ct 1/5								22,77			
NSC-AP-JMV 1/5	1,13	123	30,05	30,10	0,30	0,06	108	20,17	20,00	-100,85	0,24
NSC-AP-JMV 1/5			30,14				85	19,83			

### 5- Effets *in vivo* de la ghréline et du JMV sur la prise alimentaire chez la souris

Le nombre d'animaux par groupe est de 4, et le nombre de coupes par animal est de 2 à 8. Les figures 37 et 38 représentent la prise alimentaire sur les 4h qui suivent l'injection respectivement du JMV et de la ghréline.



**Figure 37.** Prise alimentaire quotidienne 4h après injection sous cutanée de NaCl ou de JMV 2894 (320 mg / kg **Repeated measures Anova (J1 à J22) : P<0,0001 versus NaCl**



**Figure 38.** Prise alimentaire quotidienne 4h après injection sous cutanée de NaCl ou de ghréline (320 mg / kg) **Repeated measures Anova (J1 à J20) : P<0,0001 versus NaCl**

Par rapport aux témoins « NaCl », on observe une augmentation significative de la prise alimentaire des souris injectées avec le JMV ( $P < 0.0001$  versus saline, Anova répétée J1 à J22) et ghréline ( $P < 0,000$  versus NaCl Anova répétée J1 à J20).

### 6- Effet *in vivo* du BrdU sur la prise alimentaire induite par le JMV

Dans le but de quantifier la neurogenèse *in vivo* parallèlement avec le suivi de prise alimentaire avec ou sans administration d'agoniste ghrélinergique, nous avons caractérisé l'effet du JMV-2894 sur la prise alimentaire avec ou sans administration de BrdU.

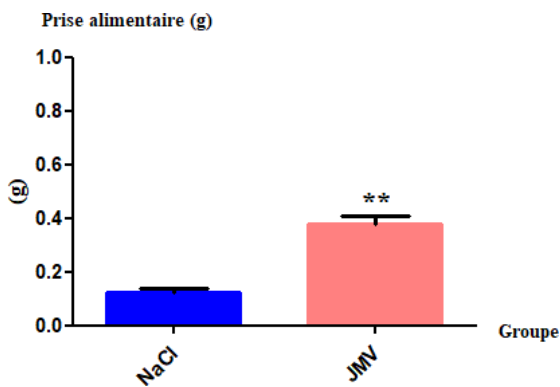


Figure 39. Prise alimentaire 4h après injection BrdU sur 7J

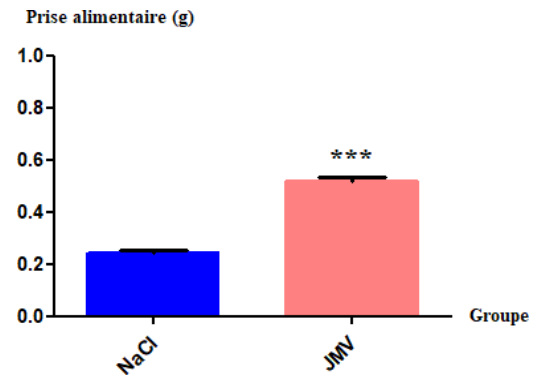


Figure 40. Prise alimentaire après 4h sans injection BrdU sur 7J

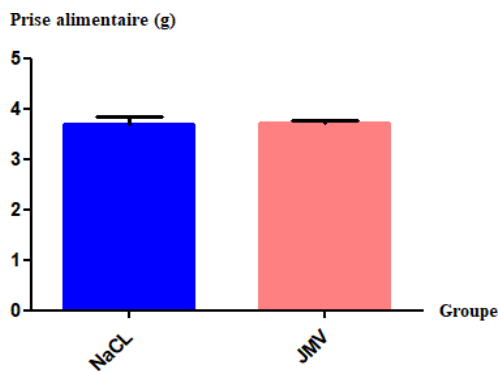


Figure 41. Prise alimentaire 24h après injection BrdU sur 7J

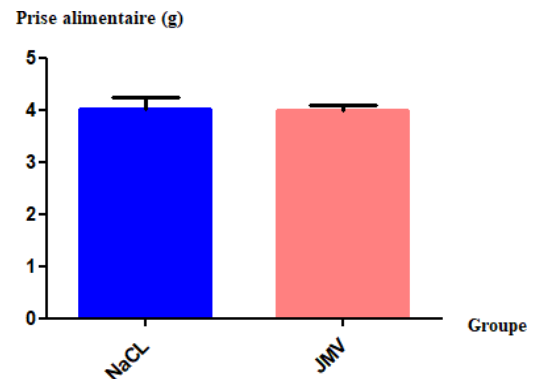


Figure 42. Prise alimentaire sur 24h sans injection BrdU sur 7J

\* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,001$ , \*\*\*  $P \leq 0,0001$  JMV versus NaCl

- La figure 39 représente la prise alimentaire avec Brdu sur 4h et elle est significativement augmentée à  $P \leq 0,001$  dans le groupe JMV versus NaCl.
- La figure 40 représente la prise alimentaire sans Brdu sur 4 et elle est significativement augmentée à  $P \leq 0,0001$  dans le groupe JMV versus le groupe NaCl.
- La figure 41 représente la prise alimentaire avec Brdu sur 24h mais il n'y a aucune différence significative entre le groupe JMV et le groupe NaCl.
- La figure 42 représente la prise alimentaire sans Brdu sur 24h mais il n'y a aucune différence significative entre le groupe JMV et le groupe NaCl.

### 7- Effet *in vivo* du BrdU sur la prise alimentaire induite par la ghréline

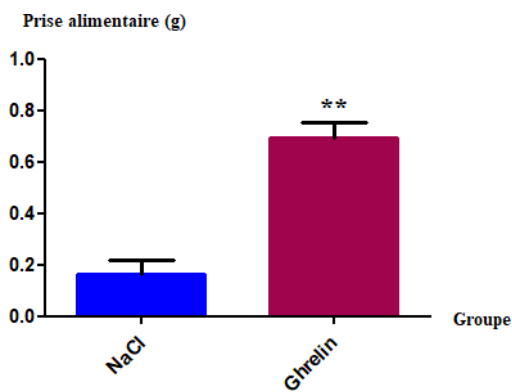


Figure 43. Prise alimentaire 4h après injection Brdu sur 7J

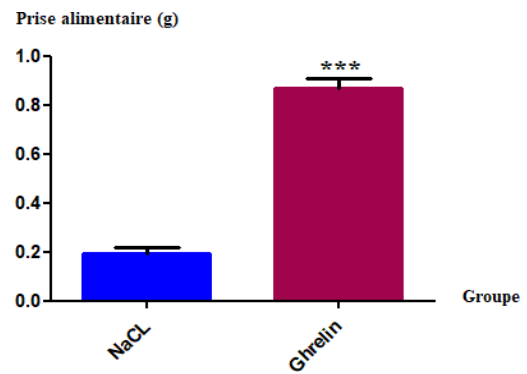


Figure 44. Prise alimentaire sur 4h sans injection de Brdu sur 7J

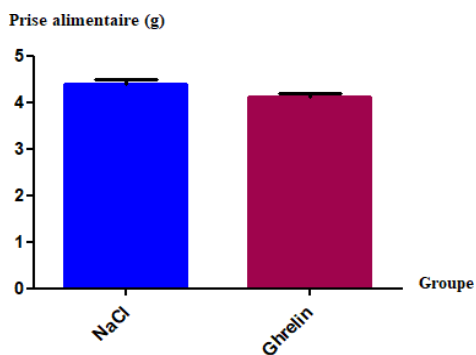


Figure 45. Prise alimentaire sur 24h après injection Brdu sur 7J

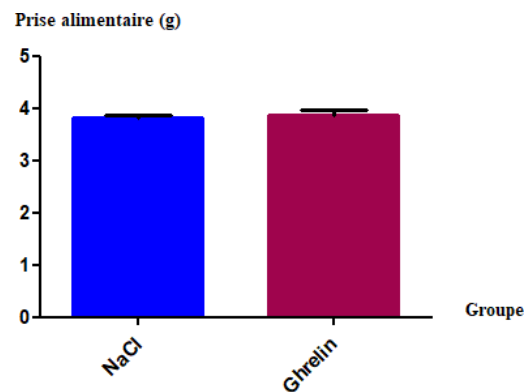


Figure 46. Prise alimentaire sur 24h sans injection de Brdu sur 7J

- La figure 43 représente la prise alimentaire avec Brdu sur 4h et elle est significativement augmentée à  $P \leq 0,001$  dans le groupe Ghreline versus NaCl.
- La figure 44 représente la prise alimentaire sans Brdu sur 4 et elle est significativement augmentée à  $P \leq 0,0001$  dans le groupe Ghreline versus le groupe NaCl.
- La figure 45 représente la prise alimentaire avec Brdu sur 24h mais il n'y a aucune différence significative entre le groupe Ghreline et le groupe NaCl.
- La figure 46 représente la prise alimentaire sans Brdu sur 24h mais il n'y a aucune différence significative entre le groupe Ghreline et le groupe NaCl.

### 8- Effets de JMV et de ghreline sur le pattern des repas

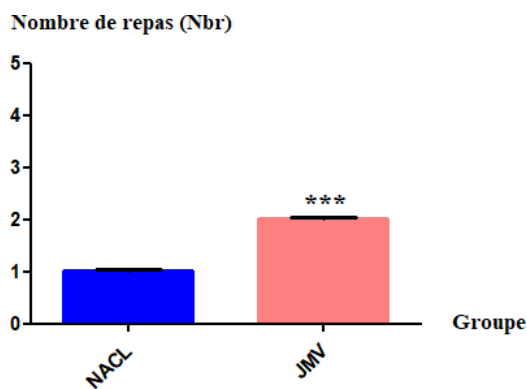


Figure 47. Nombre de repas sur 24h

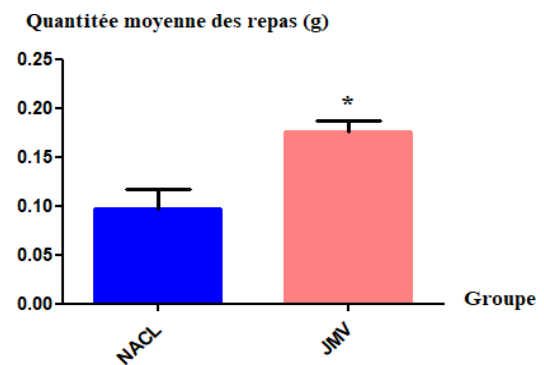


Figure 48. Quantité d'un repas sur 24h

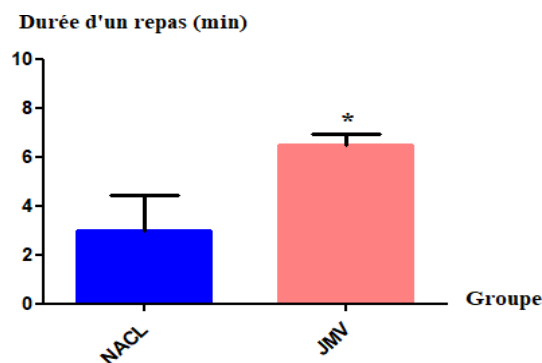


Figure 49. Durée d'un repas sur 24h

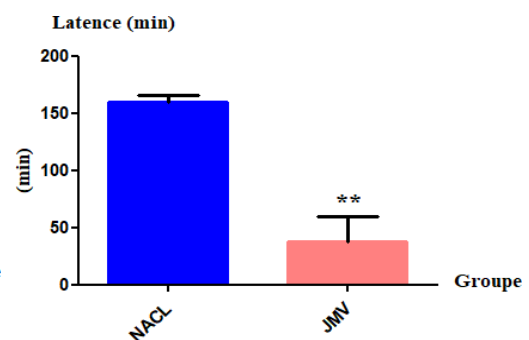


Figure 50. Durée de latence avant le premier repas après l'injection

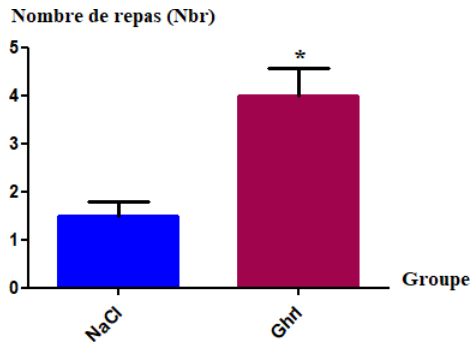


Figure 51. Nombre de repas sur 24h

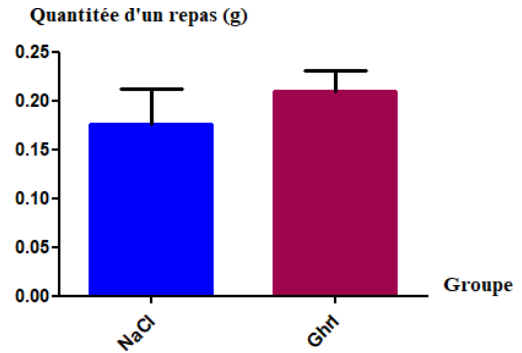


Figure 52. Quantité d'un repas sur 24h

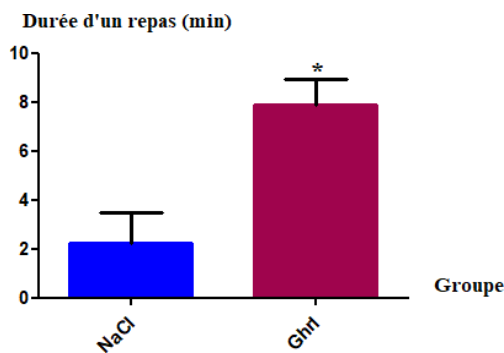


Figure 53. Durée d'un repas sur 24h

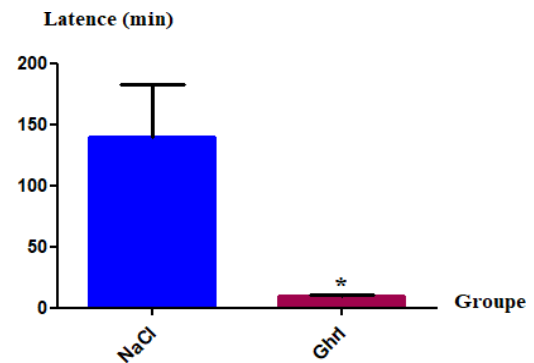


Figure 54. Durée de latence avant le premier repas après l'injection

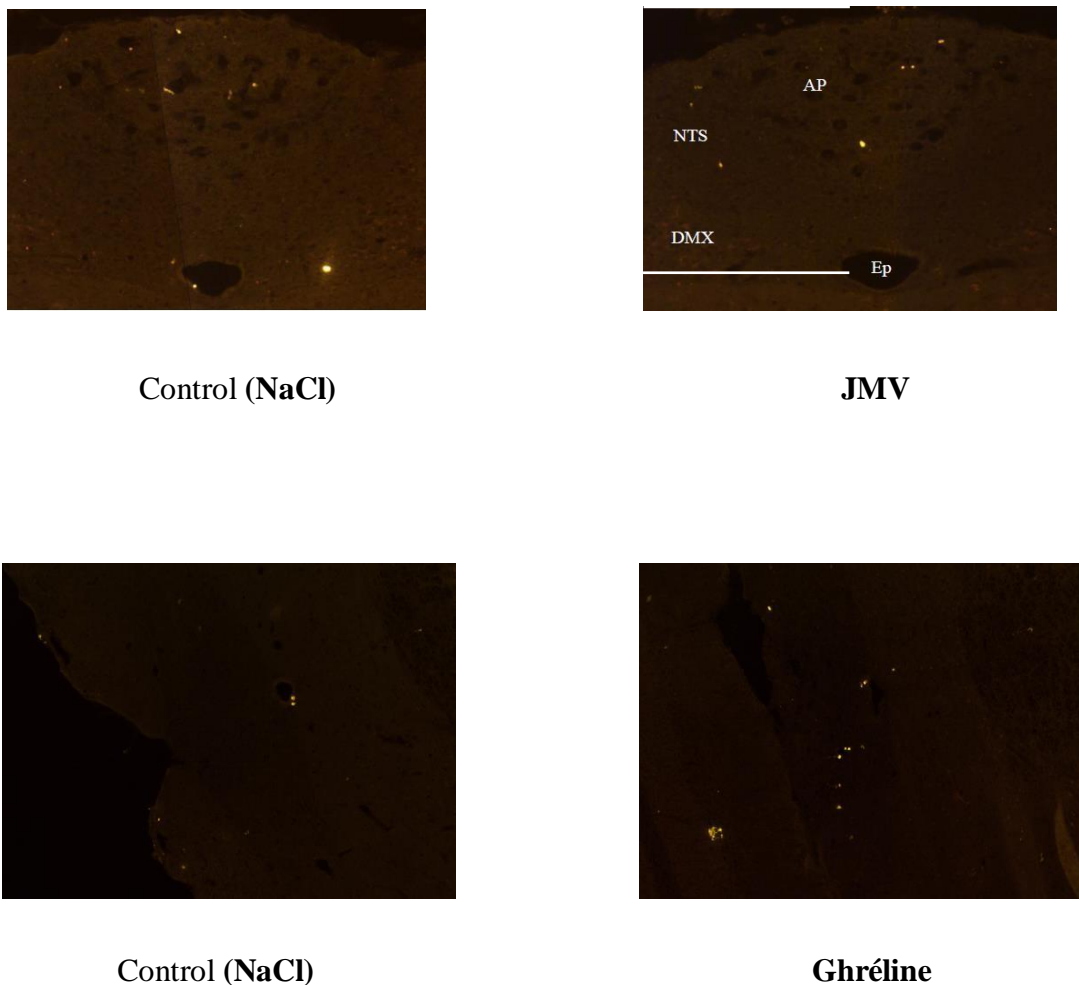
**\* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,001$ , \*\*\*  $P \leq 0,0001$  versus NaCl**

- Dans la figure 47 et 51 le nombre de repas sur 24h chez le groupe JMV et Ghréline versus NaCl est significativement plus élevé que dans les contrôles, respectivement à  $P \leq 0,05$  et  $P \leq 0,001$ .
- La quantité moyenne d'un repas sur 24h (Figure 48) est beaucoup plus élevée significativement à  $P \leq 0,05$  chez le groupe JMV versus NaCl, mais ne présente aucune différence significative entre le groupe Ghréline versus NaCl (Figure 52).
- La durée d'un repas moyennée sur 24h est significativement plus élevée sous administration de JMV (Figure 49) ou de ghréline (Figure 53) que chez les contrôles respectifs, à  $P \leq 0,05$ .

- La durée de latence du premier repas après la première injection est significativement plus élevée chez le groupe JMV (Figure 50) et Ghréline (Figure 54) que chez les groupes NaCl, respectivement avec  $P \leq 0,001$  et  $P \leq 0,05$ .

### 9- Effet du JMV-2894 et de la ghréline sur la neurogenèse *in vivo*

L'incorporation de BrdU dans l'AP a été analysée par immunohistofluorescence sur coupes sériées (10 coupes en moyenne par animal, régulièrement espacées), et les noyaux marqués (figure 55) ont été quantifiés sous le microscope pour les groupes traités au JMV et contrôles. Cette approche a montré une augmentation significative d'incorporation de BrdU par le traitement *in vivo* avec l'agoniste ghrélinergique et la ghréline (Figure 56 et Figure 57).



**Figure 55.** Marquage de noyaux Brdu, barre d'échelle 500  $\mu\text{m}$

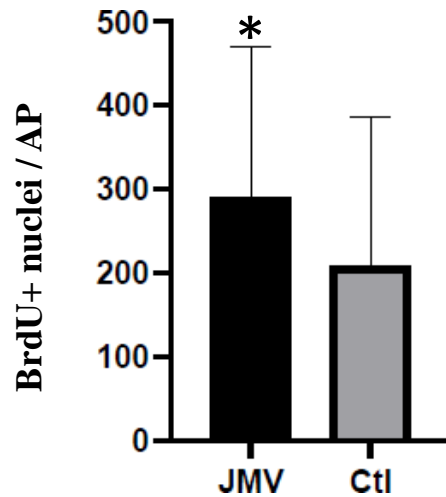


Figure 56. Effet du JMV sur la neurogenèse

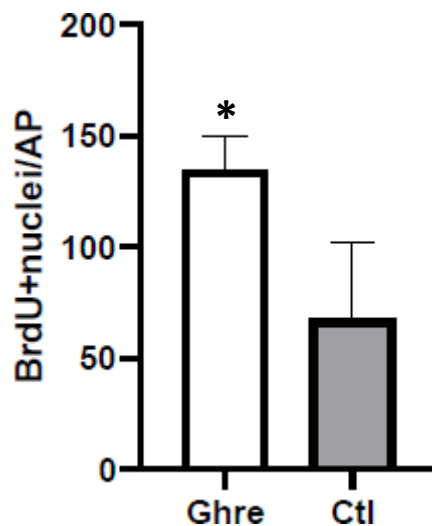


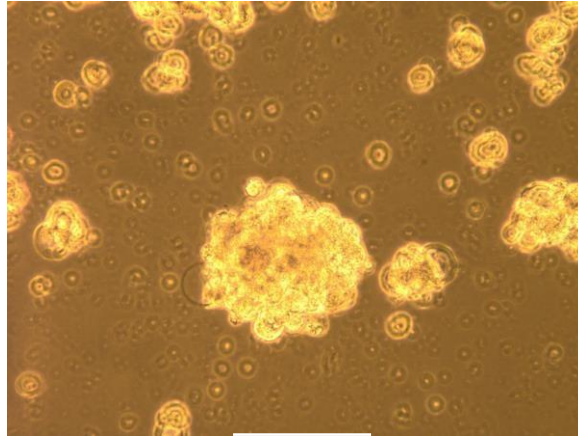
Figure 57. Effet de la Ghréline sur la neurogenèse

### 10- Effet du JMV-2894 sur les cellules-souches d'épithélium de prostate *in vitro*

Pour voir si la stimulation d'autorenouvellement par l'agoniste de ghréline s'exerce également sur une autre catégorie de cellules-souches, j'ai appliqué l'approche précédente *in vitro* sur des cultures primaires de cellules-souches d'épithélium prostatique. J'ai utilisé le protocole récemment utilisé qui est le plus favorable à répondre à cette question, à savoir la culture primaire de clones flottants ou « prostasphères » (Huang et al 2015).

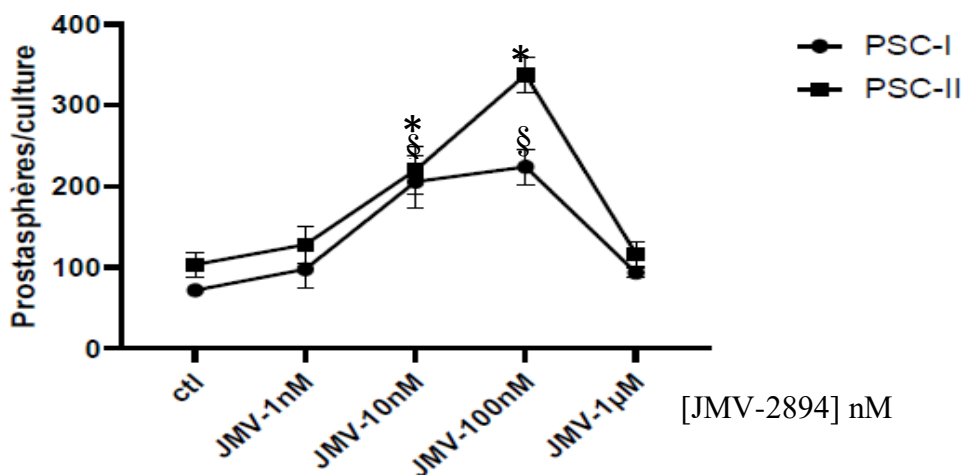
Si la suspension cellulaire primaire obtenue par dissociation mécanique et enzymatique de la prostate de Souris est cultivée dans le milieu PrEGM en présence des facteurs EGF, bFGF et B27 aux mêmes concentrations que pour le test des neurosphères sur suspension de tissu

nerveux, la majorité des cellules différenciées disparaît et il apparaît des sphères de cellules mutuellement adhérentes, les « prostasphères », dont le diamètre augmente progressivement au fil des jours et qui arrivent à maturité en 2-3 jours. Un « passage » de ces prostasphères doit être réalisé lorsque leur diamètre atteint 100µm et avant que leur centre ne commence à noircir (Figure 58).



**Figure 58.** Une prostasphère primaire à 6 jours de culture. Barre d'échelle 100µm.

La culture de prostasphères primaires en présence ou en absence de différentes doses de JMV-2894, sur 2 générations successives, indique une stimulation dose-dépendante de l'autorenouvellement de celles-ci, selon une cinétique en cloche (Figure 59). Mais en plus, le JMV-2894 provoque une augmentation dose-dépendante du nombre de prostasphères dès la 1<sup>ère</sup> génération.



**Figure 59.** Courbe dose réponse du JMV-2894 sur les prostato-sphères. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  sem de 3 déterminations. \*\*, §§ : statistiquement significatif à  $p < 0.01$  par Anova one-way suivie de test de Tukey.

## DEUXIEME PARTIE

Dans cette deuxième partie, nous nous sommes consacrés à l'analyse génétique de la ghréline et de son récepteur. Nous avons étudié la répartition des polymorphismes SNPs des gènes *GHRL* (rs696217, rs4684677 et rs34911341) et *GHS-R* (rs2922126, rs572169 et rs2948694) dans un échantillon de malades CaP et un échantillon de témoins sains et nous avons réalisé des études d'association entre les différents génotypes observés et le CaP. Nous avons également réalisé une étude d'associations entre le CaP et l'IMC. Enfin, nous avons évalué l'interaction entre les différents SNPs grâce à une analyse stratifiée utilisant l'algorithme MDR (Multifactor Dimensionality Reduction).

### 1- Description de la population d'étude

Les caractéristiques démographiques et cliniques des sujets malades et sains sont rapportées dans le Tableau 7.

**Tableau 7.** Caractéristiques démographiques et cliniques des groupes d'étude.

Caractéristiques	Témoins (n = 95) N (%)	Patients (n = 120) N (%)	p-value
<b>Age (ans)</b> Moyenne ± SD	71,59 ± 8,476	74,63 ± 9,50	0,015
<b>IMC (kg/m2)</b> Moyenne ± SD	22,89 ± 1,304	22,29 ± 2.034	0.013
<b>PSA (ng/ml)</b> Moyenne ± SD	4,26 ± 3,48	80.72 ± 24.34	0.001
<b>Gleason Score</b> < 7 (Faible)	-	38 (31,66)	-
7 (Intermédiaire)	-	48 (40,00)	-
> 7 (Elevé)	-	34 (28,33)	-
<b>Stade Clinique</b> Localisé	-	70 (58,33)	-
Avancé	-	34 (28,33)	-
Métastase	-	16 (13,33)	-
<b>Décès</b>	-	19 (15,43)	-

Au total, 215 participants (120 patients CaP et 95 témoins) ont été inclus dans l'étude. L'âge moyen des patients était  $74,70 \pm 8,38$  ans et celui des témoins  $72,26 \pm 10,13$  ans. La fréquence des décès est évaluée à 15,43%. l'incidence du CaP est plus élevée chez les patients de plus de 65 ans que chez ceux de moins de 65 ans.

Le score de Gleason (SG) le plus fréquent est égal à 7 représentant 40% des cas vs  $SG < 7$  (31,66%) et  $SG > 7$  (28,33%).

Le stade clinique localisé est majoritaire (70%) comparé au stade avancé (28,33%) et métastatique (13,33%).

Il existe une différence statistiquement significative dans la distribution selon l'âge, l'IMC et le PSA entre les patients et les témoins ( $p < 0,05$ ).

## 2- Equilibre de Hardy Weinberg

Pour les six polymorphismes étudiés, nous n'avons pas observé d'écart à l'HWE dans le groupe témoin. Toutefois, Il convient de noter que les SNPs rs696217 (*GHRL*) et rs2922126 rs572169 (*GHS-R*) n'étaient pas dans l'HWE pour les patients CaP (Tableau 8).

Un écart à l'HWE peut être la conséquence d'une erreur de génotypage conduisant à un excès d'hétérozygotes.

**Tableau 8.** HWE pour les SNPs *GHRL* (rs696217, rs4684677et rs34911341) et *GHS-R* (rs2922126, rs572169 et rs2948694) dans le groupe malade.

Gène	SNP	HWE	Non-HWE	$\chi^2$	MAF
<i>GHRL</i>	rs696217	-	$p = 2.10^{-4}$	8,021	0.199
	rs4684677	$p = 1.000$	-	0,002	0.005
	rs34911341	$p = 1.000$	-	-	0.000
<i>GHS-R</i>	rs2922126	-	$p = 5.106.10^{-4}$	15,336	0.353
	rs572169	-	$p = 2.876.10^{-7}$	17,941	0.275
	rs2948694	$p = 1.000$	-	0,183	0.032

Équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) : si  $p < 0,05$ , le SNP n'est pas en HWE.

## 3- Association des SNPs *GHRL* et *GHS-R* avec le risque de CaP

Au total, 6 SNPs ont été génotypés avec succès chez les patients CaP et chez les témoins. Le taux de réussite du génotypage pour les 6 loci était supérieur à 90 %. Les informations détaillées sur les génotypes et les allèles sont décrits dans les Tableau 10 et 11 Ainsi, la

distribution des allèles au 6 loci des gènes de la ghréline (*GHRL*) et du récepteur de la ghréline (*GHS-R*) était identique entre le groupe témoin et le groupe des patients.

La distribution allélique des polymorphismes étudiés chez la population témoin a révélé que pour les SNPs rs696217, rs4684677, rs2922126, rs572169 et rs2948694 les allèles majeurs respectifs sont G (82,1%), A (99,4%), A (67,8%), C (73,8%) et A (98,2%). Chez les patients, les fréquences des allèles majeurs pour ces mêmes SNPs sont respectivement : G (78,5%), A (99,5%), A (62,5%), C (72,1%) et A (96,2%) (Tableau 9).

**Tableau 9.** Distribution allélique et analyse d'association aux loci du gène *GHRL* (rs4684677, rs696217 et rs34911341) et *GHSR* (rs2922126, rs572169 et rs2948694) chez les patients CaP et les témoins sains.

Gène	Locus	Allèle	Témoins	Patients	OR (95% CI)	p-value
<i>GHRL</i>	rs34911341 C>T	C	170 (1,000)	200 (1,000)	-	-
	rs696217 G>T	G	n = 168 138 (0,821)	n = 214 168 (0,785)	0,794 (0,475 – 1,325)	0,376
		T	30 (0,178)	46 (0,215)		
	rs4684677 A>T	A	n = 172 171 (0,994)	n = 208 207 (0,995)	1,210 (0,075 – 19,497)	0,892
		G	1 (0,005)	1 (0,004)		
<i>GHS-R</i>	rs2922126 A>T	A	n = 174 118 (0,678)	n = 240 150 (0,625)	0.791 (0,524~1,193)	0,263
		T	56 (0,321)	90 (0,375)		
	rs572169 C>T	C	n = 160 118 (0,738)	n = 204 147 (0,721)	0.918 (0,575~1,463)	0,718
		T	42 (0,263)	57 (0,263)		
	rs2948694 T/C,G,T	A	n = 170 167 (0,982)	n = 238 229 (0,962)	2.188 (0,121~1,714)	0,234
		G	3 (0,017)	9 (0,037)		

L'analyse statistique ne démontre aucune différence significative dans la distribution des fréquences alléliques entre les patients et les témoins ( $p > 0,05$ ). Ainsi, il n'existe aucune association entre le CaP et les SNPs des gènes *GHRL* et *GHS-R* étudiés.

L'analyse du génotypage nous a permis de distinguer les génotypes homozygotes des hétérozygotes pour chacun des SNPs explorés. Le Tableau 10 montre la distribution des

génotypes des patients CaP et des témoins sains. Pour les 6 SNPs de *GHRL* et *GHS-R* étudiés, aucune association statistiquement significative avec le CaP n'a été démontrée ( $p > 0,05$ ), excepté pour le génotype T/T (SNP rs2922126 / gène *GHS-R*) qui était significativement plus fréquent chez les patients que chez les témoins ( $p = 0,040$ ). Cette donnée suggère que ce génotype pourrait être un génotype de susceptibilité au CaP.

**Tableau 10.** Distribution génotypique aux loci du gène *GHRL* (rs4684677, rs696217 et rs34911341) et *GHS-R* (rs2922126, rs572169 et rs2948694) chez les patients CaP et les témoins sains.

Gène	Locus	Génotype	Témoins	Patients	OR (95% CI)	p-value
<i>GHRL</i>	rs34911341	C/C	85 (1,000)	100 (1,000)	-	-
		G/G	54 (0,642)	61 (0,570)	0,736 (0,409 – 1,326)	0.307
	G/T	30 (0,357)	46 (0,429)			
	rs4684677	A/A	85 (0,988)	103 (0,990)	1,211 (0,074~19,663)	0.892
		A/G	1 (0,011)	1 (0,009)		
<i>GHS-R</i>	rs2922126	A/A	31 (0,356)	36 (0,300)	1,292 (0,714 – 2,317)	0,452
		A/T	56 (0,644)	78 (0,650)	0,972 (0,555 – 1,729)	0,999
		T/T	0 (0,000)	6 (0,050)	Infini	<b>0,040*</b>
	rs572169	C/C	45 (0,441)	38 (0,475)	0,872 (0,484 – 1,570)	0,649
		C/T	57 (0,559)	42 (0,525)		
	rs2948694	A/A	82 (0,965)	110 (0,924)	0,447 (0,117 – 1,7703)	0,227
		A/G	3 (0,035)	9 (0,076)		

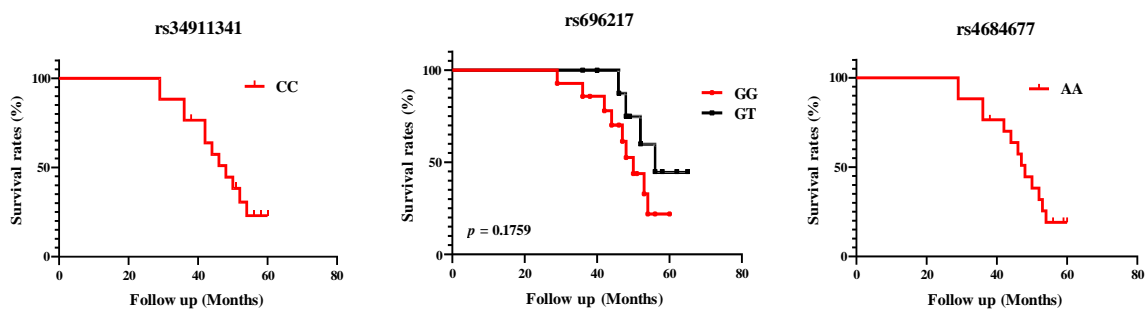
L'analyse de survie globale comprend la notion d'évènement de décès. Les associations de survie ont été évaluées par la méthode de Kaplan-Meier.

Le temps jusqu'à un évènement (décès) est mesuré comme étant le temps entre le diagnostic et la fin de l'évènement, soit environ 5 ans (60 mois après le diagnostic) ou la dernière période d'observation. Les groupes de patients ont été définis par les génotypes des 6 variants étudiés. Les patients vivants lors du dernier suivi ont été censurés, les décès étant considéré comme un évènement. L'ensemble des résultats est exprimé dans la figure 60.

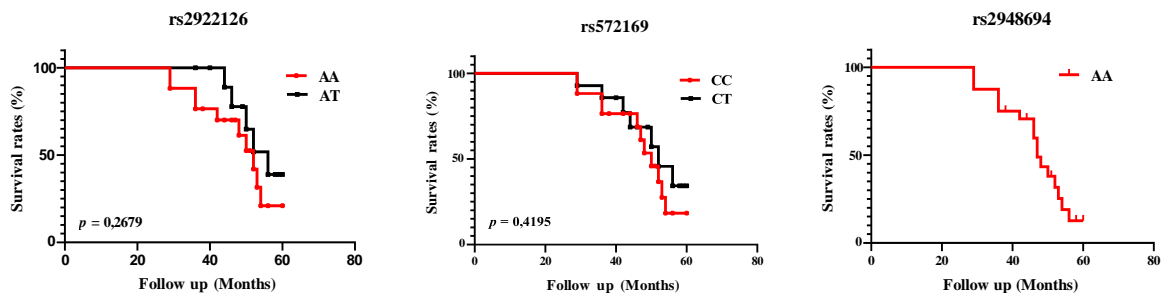
L'étude de la survie est réalisée sur 60 mois. Le temps  $T_0$  correspond au moment du diagnostic ; tous les patients décédés présentaient un CaP agressif. Concernant les variants

rs34911341 (génotype CC), rs4684677 (génotype AA) et rs2948694 (génotypes AA), étant donné qu'il n'y a aucun patient hétérozygote, nous ne pouvons pas établir une comparaison des courbes de survie par la méthode de Kaplan Meier ni de définir la probabilité par le test du log Rank. Toutefois, toutes les courbes relatives aux patients homozygotes sont identiques. L'analyse de survie de Kaplan-Meier montre une diminution non significative ( $p > 0,05$ ) de la survie globale associée aux variants *GHRL* (rs696217) et *GHS-R* (rs2922126 et rs572169).

**A**



**B**



**Figure 60.** Courbes de survie globale pour la survenue de décès des patients CaP selon les génotypes (A) *GHRL* et (B) *GHS-R*. La survie a été réalisée sur 80 mois.

#### 4- Analyse des haplotypes de *GHRL* et *GHS-R*

Les haplotypes représentent les combinaisons de plusieurs allèles au sein d'un gène ou d'une région chromosomique. Plusieurs études suggèrent que l'analyse d'haplotypes serait plus informative que l'analyse des polymorphismes isolés (Marzolini et al 2004). En effet, l'utilisation d'haplotypes (allèles combinés sur un même chromosome) à la place de génotypes (polymorphismes isolés) est généralement considérée comme un progrès majeur car elle permet une meilleure interprétation dans les analyses d'association.

Nous avons réalisé une analyse des haplotypes les plus probables afin de déterminer une éventuelle association avec un risque accru de CaP. Le Tableau 11 représente l'analyse de

haplotypes selon l'ordre physique des marqueurs géniques rs34911341, rs696217, rs4684677 (*GHRL*) et rs2922126, rs572169, rs2948694 (*GHS-R*). Ceci a permis de définir 2 haplotypes pour le gène *GHRL*, leur fréquence allant de 19,7% à 79,8% et 6 haplotypes pour le gène *GHS-R*, leur fréquence allant de 0,015% à 58,7%.

La fréquence des différents haplotypes des gènes *GHRL* et *GHS-R* aussi bien chez les malades que les témoins sont semblables; les différences ne sont pas statistiquement significatives ( $p > 0,05$ ).

D'après les résultats obtenus, l'haplotype le plus fréquent pour *GHRL* et *GHS-R* est respectivement ACA (79,8%) et ACA (58,7%).

**Tableau 11.** Haplotypes estimés dans la population étudiée.

Gene	Haplotype #	Fréquences	Témoins	Patients	$\chi^2$	<i>p-value</i>
<b><i>GHRL</i></b>	AGC	0,798	0,815	0,784	0,574	0,448
	ATC	0,197	0,179	0,211	0,621	0,430
<b><i>GHS-R</i></b>	ACA	0,587	0,599	0,577	0,195	0,658
	ATT	0,211	0,191	0,226	0,747	0,387
	ACT	0,121	0,122	0,120	0,002	0,968
	ATA	0,048	0,065	0,036	1,757	0,184
	GTA	0,018	0,016	0,019	0,061	0,805
	GCT	0,015	0,007	0,020	1,156	0,282

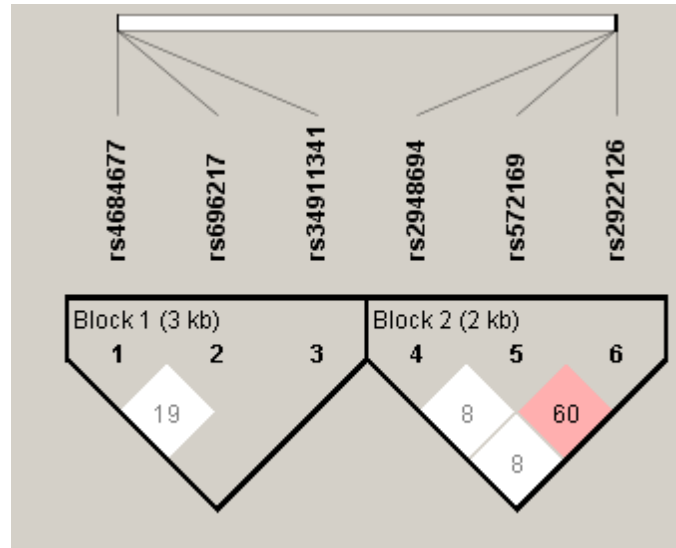
# Basé sur l'ordre physique des marqueurs: *GHRL* (rs34911341, rs696217 et rs4684677) et *GHS-R* (rs2922126, rs572169 et rs2948694).

### 5- Analyse du déséquilibre de liaison des SNPs *GHRL* et *GHS-R*

Le déséquilibre de liaison (DL ou  $D'$ ) permet de prédire l'évolution simultanée de 2 loci situés sur le même chromosome. Plus le déséquilibre de liaison est important, plus la probabilité que les deux allèles soient transmis ensemble est élevée, ce qui est particulièrement le cas pour 2 polymorphismes physiquement proches sur le chromosome.

Si  $D' > 0$ , la combinaison des 2 allèles les plus rares est favorisée ; Si  $D' < 0$ , l'allèle rare d'un polymorphisme est préférentiellement associé à l'allèle fréquent de l'autre. Ainsi, dans le cas d'un DL positif élevé, la probabilité que 2 allèles mutés soient transmis simultanément est élevée, ce qui rend difficile l'attribution des associations observées à un polymorphisme donné.

L'analyse du déséquilibre de liaison (DL) a montré que pour le gène *GHRL*, seule la combinaison des SNPs rs696217 et rs4684677 était dans un DL faible ( $D' = 0,190$ ) (Figure 61). Toutefois, il est difficile de considérer ces DL avec pertinence au vue du faible effectif des patients porteurs du génotype AG pour le variant rs4684677



**Figure 61.** Degré de DL des SNPs de *GHRL* (block 1) et *GHS-R* (block 2).

Pour le gène *GHS-R*, la combinaison rs2922126 / rs572169 présente un DL moyen ( $D' = 0,600$ ) (Figure 61). Les combinaisons des SNPs rs2922126 / rs2948694 et rs572169 / rs2948694 ne sont pas en DL ( $D' = 0,008$ ).

## 6- Relation entre les polymorphismes des gènes *GHRL*, *GHS-R* et l'IMC

En plus de l'âge et des différentes caractéristiques cliniques, les données anthropométriques ont été évaluées dont l'indice de masse corporelle (IMC). Les patients ont été divisés en 3 groupes en fonction de leur IMC :

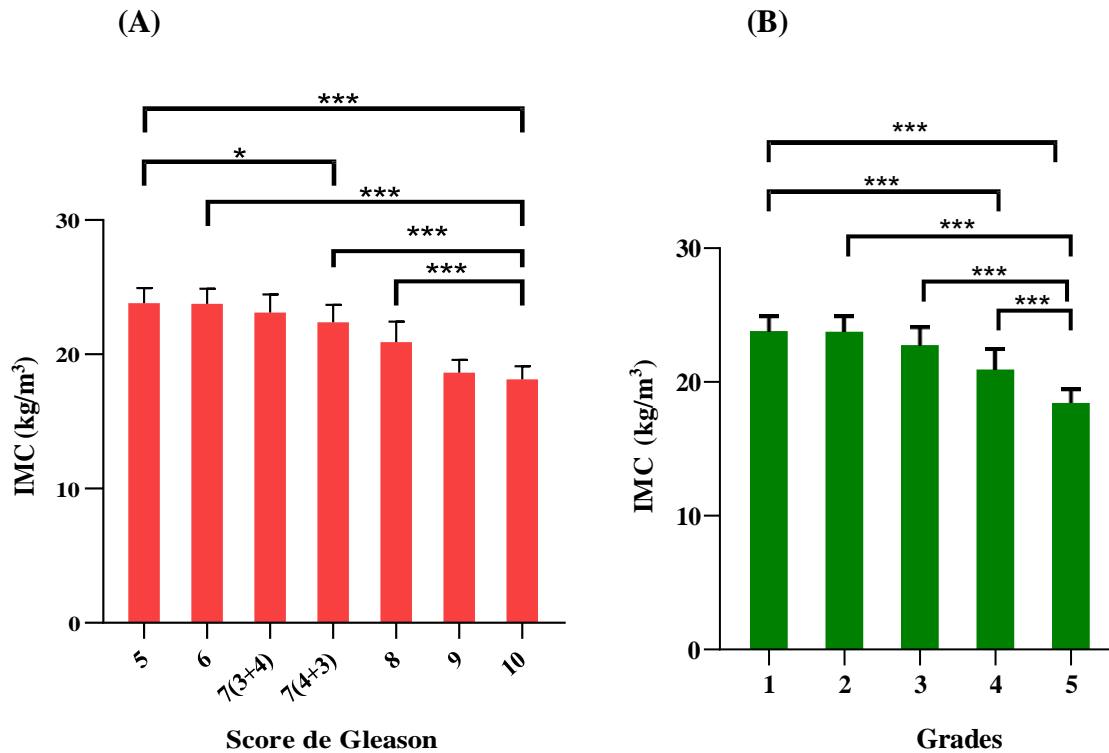
- ❖ groupe 1 : < 18,50
- ❖ groupe 2 : 18,50 – 24,90
- ❖ groupe 2 : > 25,00.

Nous avons comparé la distribution de la moyenne des IMC dans la population malade.

Il existe une différence significative ( $p < 0,0001$ ) dans les mesures de l'IMC entre les différents SG ainsi que les Grades (Figure 62 A et B).

Ainsi, concernant l'IMC, il existe une différence significative entre le SG 5 et 7(4+3) ( $p = 0,031$ ), entre le SG 5 et 8 ( $p = 0,0006$ ) et les SG 5,9 et 10 ( $p < 0,0001$ ).

Il existe une différence significative ( $p < 0,0001$ ) entre le SG 6 et les SG 7(4+3), 8, 9 et 10. Une différence significative est également obtenue entre le SG 7(3+4) ( $p < 0,0001$ ) et les SG 8, 9 et 10. Il en est de même pour le SG 7(4+3) et 8 ( $p = 0,0013$ ), et le SG 7(4+3) et Les SG 9 et 10 ( $p < 0,0001$ ).



**Figure 62.** Distribution de l'IMC chez les patients atteints du CaP en fonction (A) du score de Gleason et (B) des grades.

Enfin, une différence significative est observée entre le SG 8 et 9 ( $p = 0,0005$ ) et le SG 8 et 10 ( $p = 0,0007$ ). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec le Grade. Notons toutefois, que le grade 3 représente les SG 7(3+4) et 7(4+3), et le grade 5 les SG 9 et 10.

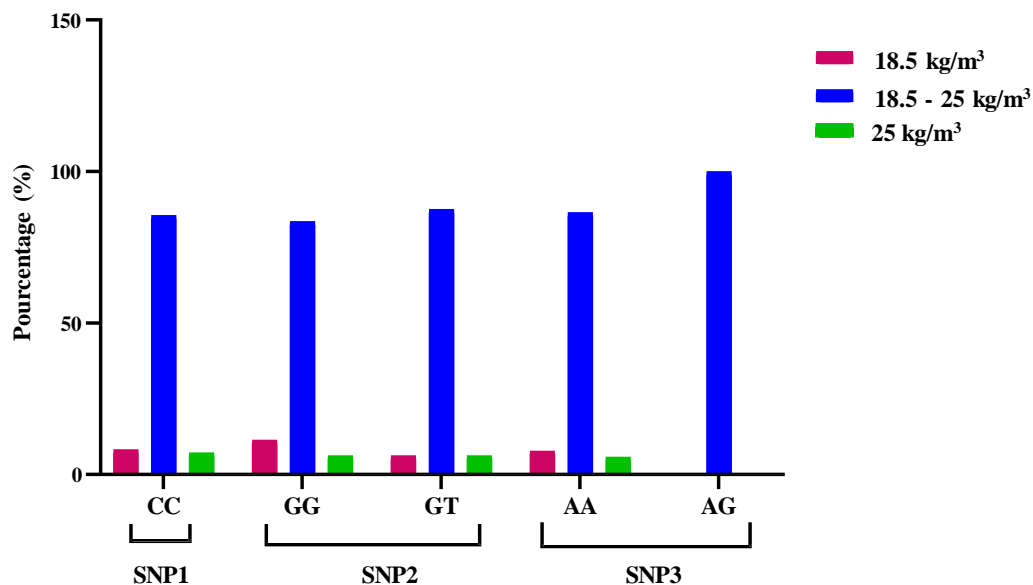
Il existe une différence significative ( $p < 0,0001$ ) entre les 3 groupes d'IMC ( $<18,50$  ;  $18,50 - 25$  ;  $>25$  kg/m<sup>3</sup>) et les génotypes étudiés (Tableau 12).

Le plus grand nombre de malades est observé dans la catégorie  $18,50 - 25$  kg/m<sup>3</sup>.

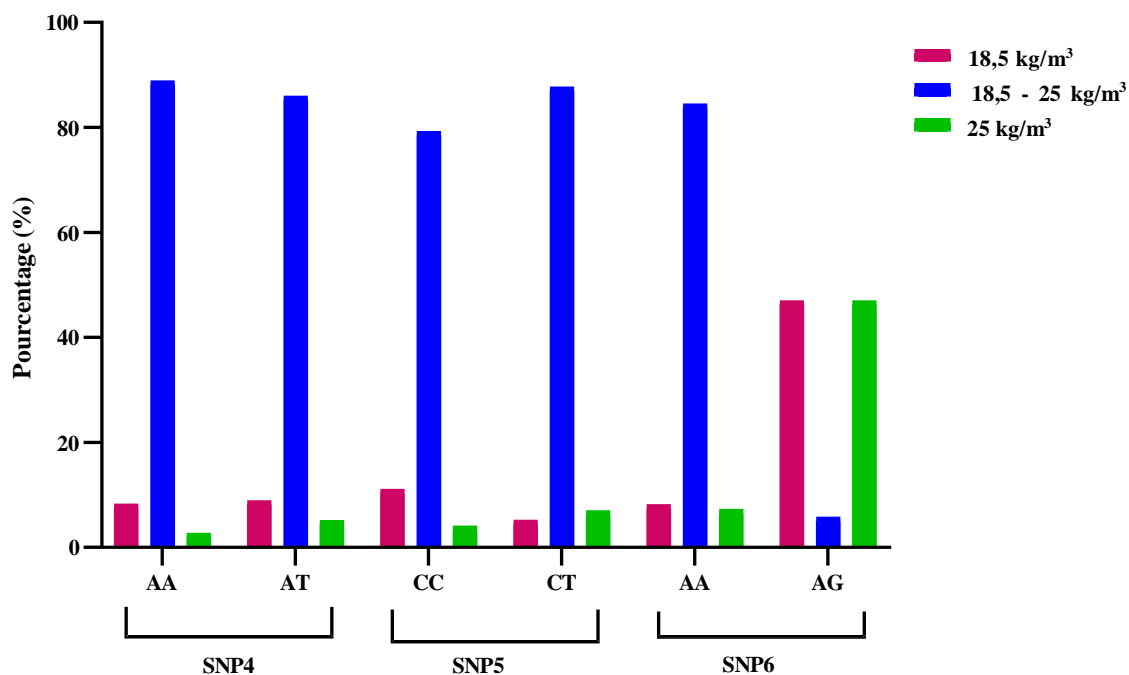
**Tableau 12.** Relation entre les polymorphismes génotypiques de *GHRL* / *GHS-R* et l'IMC chez les patients atteints de CaP

Gene	Locus	Génotypes	IMC (kg/m <sup>3</sup> )			p
			< 18,50	18,50 – 25	> 25,00	
<i>GHRL</i>	rs34911341	<b>C/C</b> n (%)	8 (0,082)	82 (0,845)	7 (0,072)	< 0,0001
		Moyenne ± SD	17,98 ± 0,473	22,51 ± 1,541	25,19 ± 0,195	
	rs696217	<b>G/G</b> n (%)	7 (0,114)	51 (0,836)	3 (0,049)	< 0,0001
		Moyenne ± SD	18,13 ± 0,335	22,49 ± 1,510	25,13 ± 0,115	
	rs4684677	<b>G/T</b> n (%)	3 (0,062)	42 (0,875)	3 (0,062)	< 0,0001
		Moyenne ± SD	17,70 ± 0,624	22,56 ± 1,694	25,27 ± 0,288	
rs4684677	<b>A/A</b> n (%)	8 (0,077)	89 (0,864)	6 (0,058)	< 0,0001	
	Moyenne ± SD	18,10 ± 0,320	22,53 ± 1,570	25,12 ± 0,075		
rs4684677	<b>A/G</b> n (%)	-	1	-	< 0,0001	
	Moyenne ± SD	-	-	-		
<i>GHSR</i>	rs2922126	<b>A/A</b> n (%)	3 (0,083)	32 (0,888)	1 (0,027)	0,0001
		Moyenne ± SD	18,23 ± 0,152	22,31 ± 1,544	-	
	rs2922126	<b>A/T</b> n (%)	7 (0,089)	67 (0,858)	4 (0,051)	< 0,0001
		Moyenne ± SD	17,90 ± 0,509	22,63 ± 1,589	25,23 ± 0,250	
	rs2922126	<b>T/T</b> n (%)	-	6	-	< 0,0001
		Moyenne ± SD	-	23,18 ± 1,499	-	
rs572169	<b>C/C</b> n (%)	5 (0,111)	38 (0,791)	2 (0,041)	< 0,0001	
	Moyenne ± SD	18,8 ± 0,192	22,35 ± 1,466	25,10 ± 0,141		
rs572169	<b>C/T</b> n (%)	3 (0,052)	50 (0,877)	4 (0,070)	< 0,0001	
	Moyenne ± SD	17,97 ± 0,493	22,63 ± 1,709	25,13 ± 0,050		
rs2948694	<b>A/A</b> n (%)	9 (0,082)	92 (0,844)	8 (0,073)	< 0,0001	
	Moyenne ± SD	18,09 ± 0,562	22,43 ± 1,569	25,11 ± 0,274		
rs2948694	<b>A/G</b> n (%)	8 (0,470)	1 (0,058)	8 (0,470)	< 0,0001	
	Moyenne ± SD	17,90 ± 0,000	-	23,09 ± 1,101		

Le génotype AG au niveau du SNP3 et SNP6 présente une particularité. Pour le SNP3, seule la catégorie IMC 18,5 – 25 kg/m<sup>3</sup> est présente. Pour le SNP6, les catégories IMC 18.50 kg/m<sup>3</sup> et IMC 25 kg/m<sup>3</sup> sont prédominantes (47%).



**Figure 63.** Distribution des patients selon l'IMC et les génotypes des SNPs du gène *GHRL*  
**SNP1** = rs34911341 ; **SNP2** = rs696217 ; **SNP3** = rs4684677



**Figure 64.** Distribution des patients selon l'IMC et les génotypes des SNPs du gène *GHS-R*  
**SNP4** = rs2922126 ; **SNP5** = rs572169 ; **SNP6** = rs2948694

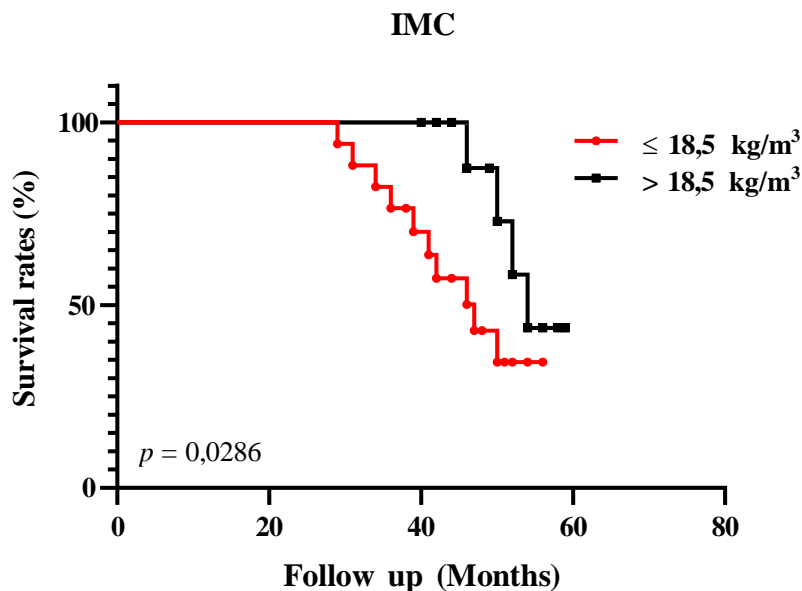
Il existe une différence significative ( $p < 0,0001$ ) entre les 3 groupes d'IMC ( $<18,50$  ;  $18,50 - 25$  ;  $>25$   $\text{kg/m}^3$ ), concernant l'âge, le score de Gleason, le grade, la localisation et le décès.

Le plus grand nombre de patients est observé dans la catégorie  $18,50 - 25$   $\text{kg/m}^3$ .

Dans le cas d'un IMC  $< 18,50$   $\text{kg/m}^3$ , le plus grand pourcentage de malades est observé dans la catégorie âge  $> 65$  ans. Un IMC  $< 18,50$   $\text{kg/m}^3$  est également observé chez les patients présentant un CaP agressif : score de Gleason  $>7$  et grade = 4 et 5. Ces résultats sont rapportés dans le Tableau 13.

Pour évaluer les chances de survie et le risque de décès des patients, nous avons utilisé la méthode d'analyse de survie de Kaplan-Meier. Les malades ont été suivis pendant 3 à 5 ans à partir de la date du diagnostic. Les groupes de patients ont été définis par les valeurs de l'IMC ( $\leq 18,50$  et  $> 18,50$   $\text{kg/m}^3$ ). Les patients vivants lors du dernier suivi ont été censurés, les décès étant considéré comme un événement.

Les âges médians des patients présentant un IMC  $> 18,50$   $\text{kg/m}^3$  étaient plus élevés (54 mois) que ceux des patients présentant un IMC  $\leq 18,50$   $\text{kg/m}^3$  (47 mois) (Figure 63). Le Log Rank  $p = 0,026$  et le Hazard Ratio (HR) est estimé à 2,5 (0,877 – 7,128).



**Figure 65.** Courbe de survie globale pour la survenue de décès des patients atteints de CaP selon l'IMC. La survie a été réalisée sur 60 mois.

**Tableau 13.** Caractéristiques clinico-pathologiques au moment du diagnostic et distribution des IMC chez les patients atteints de CaP

		Total patients Par catégorie	IMC (kg/m <sup>3</sup> )			p-value
			< 18,50	18,50 – 25	> 25,00	
Age (ans)	≤ 65	20 21,99 ± 2,191	2 (0,010) 18,20 ± 0,163	17 (0,850) 22,58 ± 1,363	1 (0,050) 25,20 ± 0,000	< 0,0001
	> 65	96 21,95 ± 1,992	7 (0,072) 18,20 ± 0,163	83 (0,864) 22,49 ± 1,585	6 (0,062) 25,18 ± 0,213	< 0,0001
Score de Gleason	< 7	38 (0,316) 24,36 ± 1,102	-	29 (0,241) 23,52 ± 0,982	9 (0,075) 25,20 ± 0,209	< 0,0001
	= 7	48 (0,400) 22,84 ± 1,135	-	48 (0,400) 22,84 ± 1,135	-	-
	> 7	34 (0,283) 19,35 ± 1,802	9 (0,075) 17,97 ± 0,466	25 (0,208) 20,73 ± 1,513	-	< 0,0001
Grade	1	52 (0,433) 24,38 ± 1,030	-	48 (0,400) 23,56 ± 0,966	4 (0,033) 25,20 ± 0,270	< 0,0001
	2	48 (0,400) 24,25 ± 0,865	-	47 (0,391) 23,40 ± 0,847	1 (0,008) 25,10 ± 0,000	< 0,0001
	3	25 (0,208) 22,43 ± 1,257	-	25 (0,208) 22,43 ± 1,257	-	-
	4	22 (0,183) 18,45 ± 1,472	1 (0,008) 17,90 ± 0,000	21,00 (175) 19,00 ± 1,348	-	< 0,0001
	5	13 (0,108) 18,70 ± 0,965	9 (0,075) 18,01 ± 0,478	4 (0,033) 19,40 ± 1,158	-	< 0,0001
Localisation	Localisé	77 (0,641) 24,25 ± 1,096	-	70 (0,583) 23,33 ± 1,004	7 (0,058) 25,17 ± 0,197	< 0,0001
	Avancé	37 (0,308) 21,68 ± 1,522	-	37 (0,308) 21,68 ± 1,522	-	-
	Métastase	22 (0,183) 19,15 ± 1,484	10 (0,083) 18,00 ± 0,452	12 (0,100) 20,30 ± 1,190	-	< 0,0001
Décès	19 (15,83) 19,18 ± 1,695	7 (5,83) 17,89 ± 0,504	12 (10,00) 20,48 ± 1,367		< 0,0001	

## **7- Evaluation des interactions gène/gène et gène/environnement : résultats Multifactor Dimensionality Reduction (MDR)**

La Réduction Multifactorielle de Dimensionnalité (MDR) est une méthode de sélection de modèle non paramétrique, dont le concept est de considérer, une à une, toutes les combinaisons de loci possibles. Cette méthode se résume en 3 étapes principales : i) calcul du ratio cas/témoins pour chaque combinaison de génotypes, ii) classification de chaque combinaison en "haut risque" ou "faible risque", iii) estimation de l'erreur de prédiction *via* une validation croisée (Ritchie et al 2001 , Moore et al 2006).

Cette méthode démarre avec une structure à plusieurs marqueurs et plusieurs génotypes aux marqueurs (structure à haute dimensionalité) pour aboutir à une structure à génotype à haut risque/génotype à bas risque (structure à une seule dimension). Chaque combinaison de loci donne un modèle qui classe les individus possédant un génotype à bas risque comme non malade et un génotype à haut risque comme malade. Le modèle qui maximise le ratio cas/contrôle des génotypes à haut risque est sélectionné sur l'ensemble des modèles de même taille.

Les modèles de chaque taille sont évalués par quatre mesures : la précision de formateur associée "Training Bal. Accuracy", la précision de prédiction "Testing Bal. Accuracy", et la constance de validation croisée "CV Consistency". Ces mesures nous permettent de prendre une décision quant à la présence et la nature des interactions génétiques suggérées par les données (Sanche 2008).

Toutefois, il faudrait porter une attention particulière aux résultats de sélection de modèles lorsqu'il y a un DL.

### **7.1 Interactions Gène-Gène**

Les variables SNPs des gènes *GHRL* et *GHS-R* ont été incluses dans le modèle interaction Gène-Gène.

Le tableau 14 résume les résultats de l'analyse MDR exhaustive évaluant toutes les combinaisons possibles des 6 SNPs inclus pour prédire les modèles interactifs.

La présence des polymorphismes rs2922126 et rs572169 représente le meilleur modèle parmi tous les facteurs inclus.

Ce modèle avait une précision maximale du test équilibré de 0,8108, une CVC de 10/10 et une valeur  $p$  significative de 0,0001.

**Tableau 14.** Résultats de l'analyse MDR : interaction gène – gène.

Modèles prédictifs	Training balanced accuracy	Testing balanced accuracy	CV Consistency	$p$ -value
rs2922126	0,6780	0,5631	7/10	0.2368
rs572169, rs2922126	0,8235	0,8108	10/10	0.0001
rs572169, rs696217, rs2922126	0,8335	0,8198	7/10	0.0046
rs572169, rs34911341, rs696217, rs2922126	0,8370	0,8198	7/10	0.0467
rs572169, rs34911341, rs696217, rs4684677, rs2922126	0,8003	0,6622	10/10	0.0015

Le modèle ayant la plus grande précision de test et le CVC le plus élevé a été considéré comme le meilleur modèle. Les  $p$ -values sont basées sur 1000 permutations.

La figure 66 montre le résumé des modèles d'interaction par réduction de la dimensionnalité multifactorielle (MDR).

Les interactions entre les polymorphismes des gènes *GHRL* et *GHS-R* chez les patients souffrant de CaP sont représentés au niveau du dendrogramme (Figure 66A). Les couleurs représentent le degré de synergie, allant du rouge (gain d'information le plus élevé) au bleu (redondance de l'information).

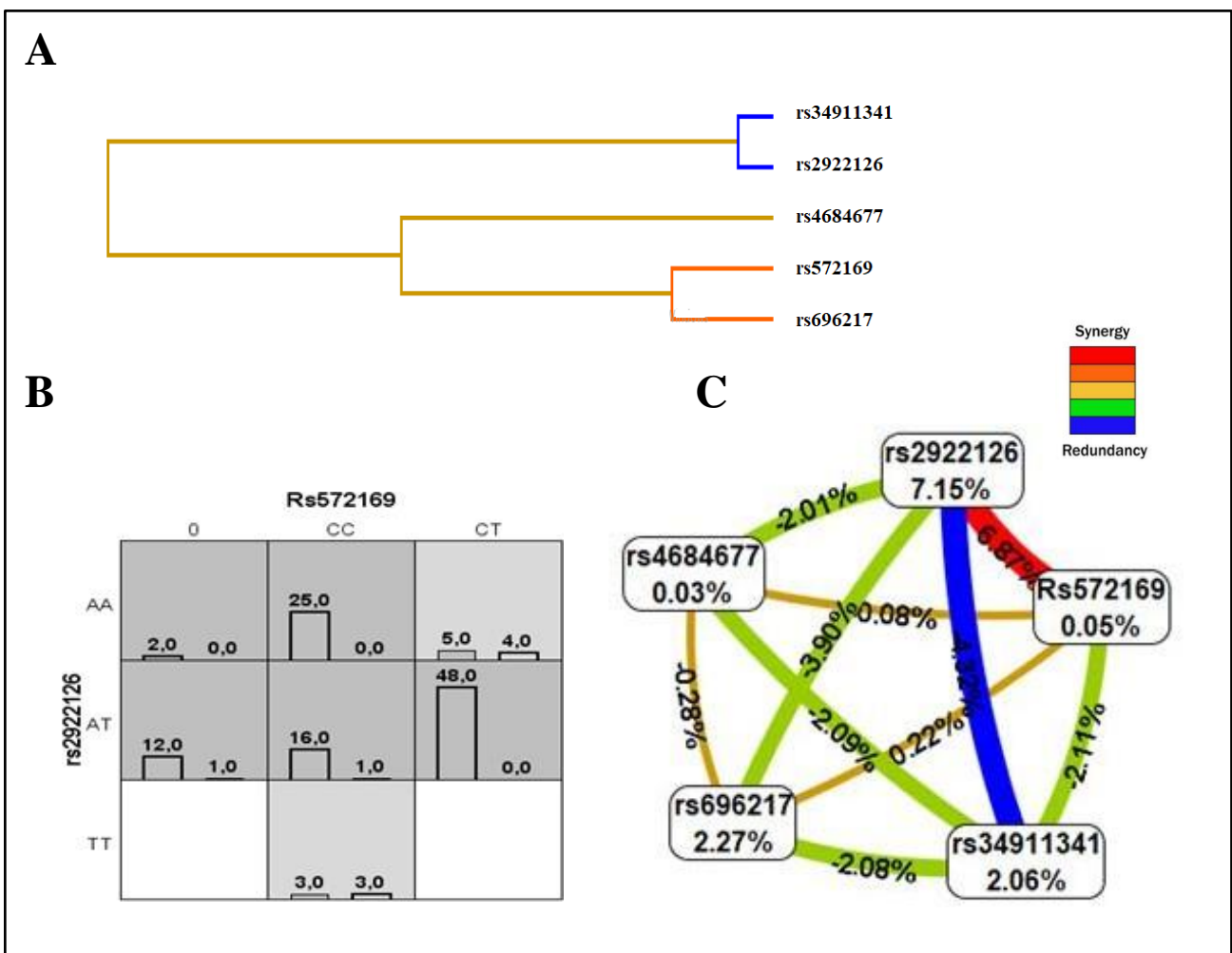
Les combinaisons de génotypes à haute fréquence chez les patients CaP) sont représentées par des cellules ombrées en foncé. Les combinaisons de génotypes à faible fréquence chez ces individus sont représentées par des cellules légèrement ombrées. Pour chaque cellule, la barre de gauche indique le nombre absolu d'individus témoins et la barre de droite le nombre absolu d'individus malades (Figure 66B).

La carte d'interaction de tous les polymorphismes évalués pour le risque de CaP sur la base des mesures d'entropie entre les variables individuelles a révélé un fort effet d'interaction synergique observé entre les deux loci rs2922126 et rs572169 avec un gain d'information de 6,87% (ligne rouge). Le modèle d'interaction décrit le pourcentage de l'entropie (gain d'information) expliquée par chaque facteur ou interaction à 2 voies. Les valeurs à l'intérieur des nœuds indiquent le gain d'information des attributs individuels ou effets principaux, tandis que les valeurs entre les nœuds indiquent le gain d'information des combinaisons par paire d'attributs ou effets d'interaction. Une entropie positive (représentée en rouge ou orange)

indique une interaction, qui peut être interprétée comme une relation synergique ou non additive, tandis qu'une entropie négative (représentée en vert ou bleu) indique une additivité (redondance). L'indépendance est représentée par la couleur or (Figure 66C).

Les contributions individuelles des polymorphismes rs696217 (2.27%), rs4684677 (0,03%), rs34911341 (2.06%), rs2922126 (7,15%) et rs572169 (0,05%) présentées dans la figure 65C sont en parfaite corrélation avec les associations non significatives décrites dans le tableau 10 ; de plus, l'interaction entre ces mêmes SNPs était redondante ou antagoniste (lignes bleues et vertes).

L'interaction entre rs696217 et rs4684677 d'une part et rs2922126 et rs572169 d'autre part, est en parfaite corrélation avec les résultats de DL.



**Figure 66.** Résumé des modèles d'interaction par réduction de la dimensionnalité multifactorielle (MDR). (A) Dendrogramme des interactions entre les SNPs étudiés. (B) Combinaisons de génotypes à haute et faible fréquence chez les patients CaP. (C) Carte des interactions pour le risque de CaP.

## 7.2 Interactions Gène-Environnement

La présence des polymorphismes rs4684677, rs34911341, IMC représente le meilleur modèle parmi tous les facteurs inclus.

Le modèle ayant la plus grande précision de test et le CVC le plus élevé a été considéré comme le meilleur modèle. Les *p-values* sont basées sur 1000 permutations.

Les variables SNPs des gènes *GHRL* et *GHS-R* ainsi que l'IMC ont été incluses dans le modèle.

**Tableau 15.** Résultats de l'analyse MDR : interaction gène – environnement.

Modèles prédictifs	Training balanced accuracy	Testing balanced accuracy	CV Consistency	<i>p-value</i>
IMC	0,5595	0,5345	9/10	0,0056
rs34911341, IMC	0,5652	0,5175	8/10	0,0024
rs4684677, rs34911341, IMC	0,5918	0,5684	10/10	0,0019
rs696217, rs4684677, rs34911341, IMC	0,5255	0,4836	10/10	0,0386

### a) Cas du gène *GHRL*

Le tableau 15 résume les résultats de l'analyse MDR évaluant les combinaisons possibles de l'IMC et des SNPs du gène *GHRL* inclus pour prédire les modèles interactifs.

Le modèle rs4684677, rs34911341, IMC est le meilleur parmi les facteurs inclus.

Ce modèle avait une précision maximale du test équilibré de 0,5345, une CVC de 10/10 et une valeur *p* significative de 0,0019.

La Figure 67 montre le résumé des modèles d'interaction Gène-Environnement par réduction de la dimensionnalité multifactorielle (MDR).

Les interactions entre les polymorphismes du gène *GHRL* et l'IMC chez les patients souffrant de CaP sont représentés au niveau du dendrogramme (Figure 67A).

La distribution des génotypes à haut risque et à faible risque dans le meilleur modèle (Figure 67B) est en corrélation avec les résultats de la figure 63.

La présence de l'IMC augmente les effets interactifs entre rs4684677 et rs34911341 (Figure 67C).



Ce modèle avait une précision maximale du test équilibré de 0,6298, une CVC de 10/10 et une valeur  $p$  significative de 0,0386.

**Tableau 16.** Résultats de l'analyse MDR.

Modèles	Training balanced accuracy	Testing balanced accuracy	CV Consistency	$p$ -value
rs572169	0,5667	0,4974	6/10	<0,0001
rs572169, rs2922126	0,6206	0,6206	10/10	<0,0001
rs572169, rs2922126, IMC	0,6638	0,6285	10/10	0,0019
rs572169, rs2922126, rs2948694, IMC	0,6709	0,6298	10/10	0,0386

Le modèle ayant la plus grande précision de test et le CVC le plus élevé a été considéré comme le meilleur modèle. Les  $p$ -values sont basées sur 1000 permutations.

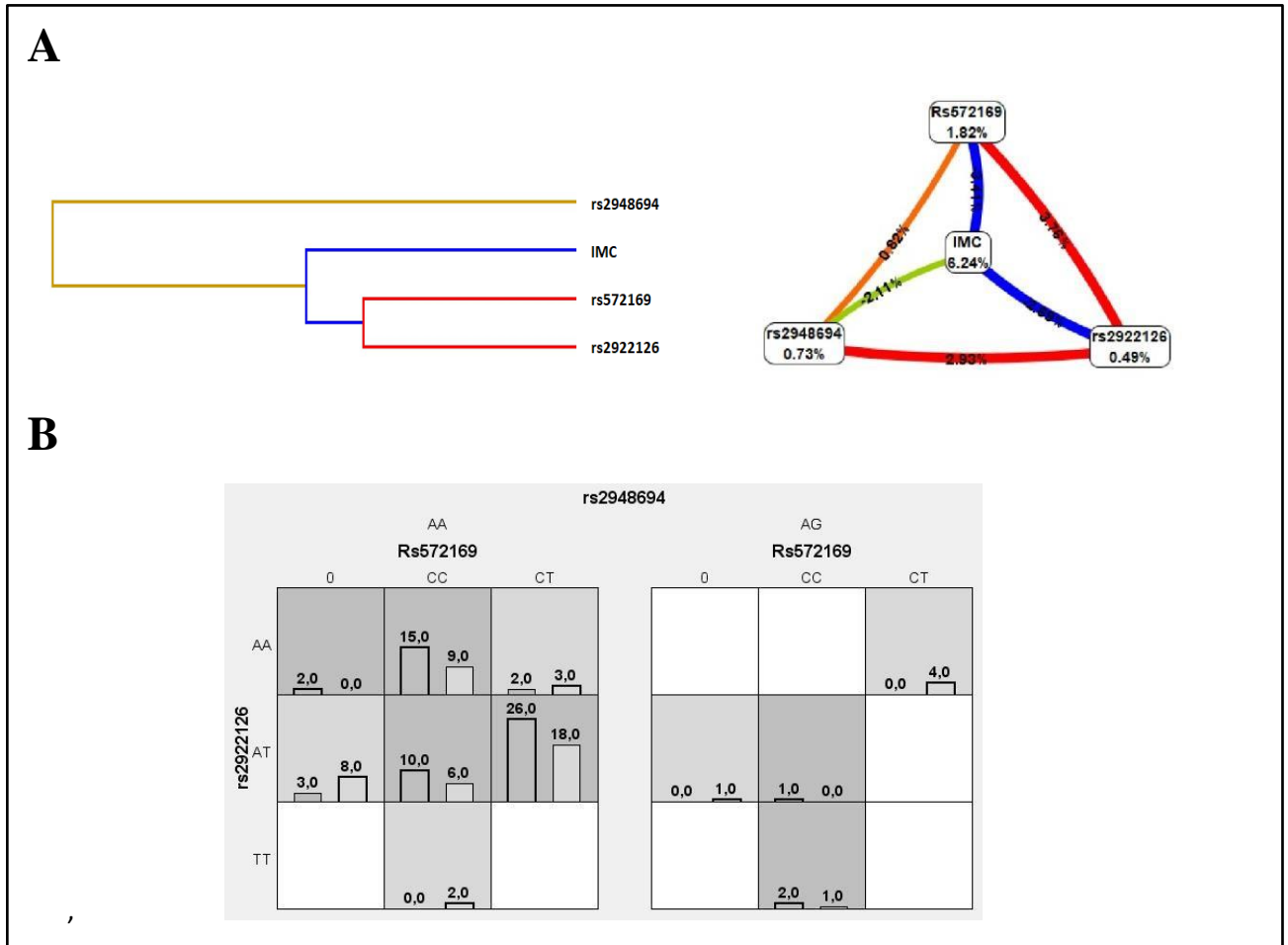
La figure 68 montre le résumé des modèles d'interaction Gène-Environnement par réduction de la dimensionnalité multifactorielle (MDR).

Les interactions entre les polymorphismes du gène *GHS-R* et l'IMC chez les patients atteints de CaP sont représentés au niveau du dendrogramme (Figure 68A).

La distribution des génotypes à haut risque et à faible risque dans le meilleur modèle (Figure 68B) est en corrélation avec les résultats de la Figure 64.

La présence de l'IMC augmente les effets interactifs entre rs572169, rs2922126 et rs2948694 (Figure 68C).

Les contributions individuelles des polymorphismes rs572169 (1,82%), rs2922126 (0,49%), rs2948694 (0,73%) présentées dans la Figure 67C sont en corrélation avec leur associations non significatives avec le CaP. Leur interaction avec l'IMC était redondante ou antagoniste (lignes bleues et vertes).



**Figure 68.** Résumé des modèles d'interaction par réduction de la dimensionnalité multifactorielle (MDR). (A) Dendrogramme des interactions entre les IMC et SNPs étudiés. (B) Combinaisons de génotypes et IMC à haute et faible fréquence chez les patients CaP. (C) Carte des interactions pour le risque de CaP.

En conclusion, le modèle MDR a révélé un modèle de prédiction du risque qui avait une précision de 91,6 % dans la prédiction du risque de cancer du col de l'utérus avec une précision de 98,1 % ( $p < 0,0001$ ). L'aire sous la courbe ROC PR-AUC était de 1,00.

Le score F1 est une mesure combinée de la précision et de la sensibilité. Il est calculé selon la formule suivante  $F1 = 2 \times (\text{Précision} \times \text{Sensibilité} / (\text{Précision} + \text{Sensibilité}))$ . La valeur F était de 0,953 et le coefficient de corrélation de Matthews (CCM) de 1,544.

La valeur PR-AUC de 1 atteinte dans notre modèle signifie une performance exemplaire, atteignant une précision et un rappel maximaux pour tous les seuils de classification. Ce résultat exceptionnel souligne la capacité robuste du modèle à identifier avec précision les données positives tout en minimisant les faux positifs.

## **Discussion et conclusion**

## **PREMIERE PARTIE**

L'étude *in vitro* de l'effet de l'agoniste de ghréline JMV-2894 sur la croissance des neurosphères primaires d'area postrema (AP) de Souris adulte a montré que cet agoniste peut augmenter la neurogenèse de l'area postrema, en stimulant l'autorenouvellement des CSN de cette structure. En effet, l'augmentation du nombre de neurosphères par génération à chaque passage est significativement augmentée par la présence de l'agoniste à doses optimales dans le milieu, par rapport aux cultures témoins. En revanche le taux de prolifération basale n'est pas affecté par l'agoniste ghrélinergique. Le même résultat a été observé parallèlement, avec les mêmes protocoles, en administrant la ghréline elle-même au lieu du JMV-2894 (Benharrat-Chaibi et al 2019). Nos résultats montrent aussi que ces actions de la ghréline et du JMV-2894 suivent une cinétique « en cloche », avec une dose d'efficacité maximale de 100 nM. Une stimulation proliférative des cellules-souches neurales par la ghréline *in vitro* a été démontrée antérieurement dans deux autres niches neurogéniques de Souris adulte : l'hippocampe (Li et al 2013a, Chung et al 2013) et la zone sous-ventriculaire (Li et al 2014). Par contre, ces études n'avaient pas permis de spécifier l'effecteur-cible de la ghréline: division basale ou auto-renouvellement.

La RTqPCR sur des culots de neurosphères d'AP de 2ème génération, qui avaient été cultivées en absence ou en présence de JMV-2894 à 100 nM (la dose optimale de stimulation de l'autorenouvellement), a montré que ces neurosphères expriment fortement les gènes de la cycline-D1 (marqueur d'entrée dans le cycle de division cellulaire) et le récepteur GHSR-1a. L'expression du récepteur GHSR-1a par les cellules de neurosphères est cohérente avec l'effet spécifique dose-dépendant des agonistes de ce récepteur ; mais pour une démonstration formelle de la médiation de ces actions ghrélinergiques par le GHSR-1a, il aurait fallu démontrer *in vitro* qu'elles sont bloquées par l'inactivation du récepteur (soit par un antagoniste, soit par étude de neurosphères dérivées de souris knockout pour le récepteur). Le traitement *in vitro* par le JMV-2894 n'entraînait aucune variation d'expression de ces 2 gènes. Cela indique que l'incubation continue avec l'agoniste JMV-2894 pendant 2 semaines n'entraîne ni désensibilisation, ni surexpression du récepteur.

La portée physiologique de la stimulation de neurogenèse de l'AP ainsi caractérisée *in vitro*, a été confirmée ensuite *in vivo* par quantification de l'incorporation de BrdU sur coupes histologiques d'AP dans une cohorte de Souris adultes traitées par injections quotidiennes de JMV-2894 versus liquide physiologique. Le traitement par le JMV-2894 à une dose physiologiquement active (cf ci-dessous) entraîne en effet une augmentation significative de 30% du nombre total de noyaux BrdU+ dans l'area postrema. Ce résultat est compatible avec la stimulation d'autorenouvellement qui a été démontrée précédemment par l'approche *in vitro*.

La dose de JMV-2894 utilisée dans cette dernière expérience a été déterminée d'après des articles pharmacologiques antérieurs (Hassouna et al 2013, Bresciani et al 2017). Afin de vérifier la pertinence physiologique de la dose choisie dans nos expériences, les animaux qui ont été analysés pour l'effet de l'agoniste JMV-2894 sur l'incorporation de BrdU dans l'AP, ont été suivis avant et pendant toute la durée de cette expérience pour la mesure de leur comportement alimentaire en cages métaboliques informatisées.

Il a été ainsi vérifié que les doses de JMV-2894 et de ghréline utilisées dans la présente étude augmentaient significativement la prise alimentaire quotidienne et, donc, entraînaient bien l'action orexigène classiquement connue de la ghréline. De plus, mes analyses apportent des précisions originales sur la modulation ghrélinergique du comportement alimentaire par rapport à la littérature antérieure, comme suit.

La stimulation de prise alimentaire quotidienne par injections répétées de chacun des deux agonistes, chaque jour pendant 3 semaines, se maintient sans modification toute la durée du traitement. Cela indique l'absence de désensibilisation de l'organisme à ces traitements orexigènes, ce qui incite à utiliser ces agonistes en clinique humaine pour stimuler l'appétit chez des patients dénutris chroniquement, souffrant par exemple de cachexie cancéreuse.

La combinaison du traitement par le JMV ou la ghréline chez la souris adulte avec une administration de BrdU pendant 7 jours (dans le but de marquer la neurogenèse au niveau du cerveau) fait disparaître l'effet orexigène de ces deux agonistes, quand la prise alimentaire est mesurée de façon cumulée sur 24 heures. Il est en effet notoire que le traitement systémique chronique par le BrdU inhibe significativement la prise alimentaire quotidienne et la croissance pondérale (Chigr et al 2009). En revanche, l'effet orexigène reste manifeste et significatif si on limite la mesure de prise alimentaire aux 4 heures suivant l'injection d'agoniste. Nous en déduisons que l'administration de BrdU diminue mais n'empêche pas l'action orexigène des agonistes ghrélinergiques chez la Souris adulte.

Le nombre des repas par 24h est augmenté significativement par chacun des traitements ghrélinergiques par rapport aux témoins, davantage par la ghréline que par le JMV-2894. C'est le cas aussi pour la durée moyenne d'un repas.

La durée de latence avant le premier repas suivant l'injection d'agoniste est significativement et fortement diminuée par rapport aux témoins, par chacun des traitements ghrélinergiques, davantage pour la ghréline que pour le JMV-2894.

La quantité moyenne de prise alimentaire par repas est augmentée significativement par le JMV-2894 par rapport aux témoins, mais n'est pas modifiée par la ghréline.

Au total, les effets orexigènes des deux agonistes, aux doses choisies ici, sont globalement similaires, sauf le paramètre quantité de prise alimentaire par repas qui n'est pas affecté par la ghréline. L'agoniste JMV-2894 est donc légèrement plus efficace que la ghréline comme agent orexigène.

Sur ces bases, il était projeté d'analyser l'effet physiologique de l'abolition de neurogenèse de l'area postrema *in vivo* sur le comportement de prise alimentaire chez la souris adulte, par irradiation sélective du complexe vagal dans l'irradiateur du CEA de Fontenay-aux-Roses puis transfert des souris vers l'animalerie du Centre de Psychiatrie et Neurosciences INSERM. La calibration préliminaire (dose de rayonnements appliqués et réglages topographiques des faisceaux sous anesthésie) avait été réalisée, mais la demande d'autorisation éthique (cf annexe 1) a été refusée in fine à cause d'incompatibilités entre les exigences des deux animaleries concernées.

Les retombées cliniques de la stimulation d'appétit par les agonistes ghrélinergiques que j'ai caractérisée chez la souris, sont contestables a priori par des données sporadiques de la littérature qui documentent des stimulations prolifératives par la ghréline ou ses agonistes. Ce type d'effet a été rapporté sur des cellules d'origine tumorale ou même sur des cellules-souches saines, entre autres neurales comme dans le présent travail et dans une série de publications antérieures sur d'autres niches neurogéniques.

Mon étude préliminaire de l'action du JMV-2894 sur les cellules-souches d'épithélium prostatique de Souris adulte s'inscrivait dans cette préoccupation. Le CaP est en effet admis comme dérivant de cellules-souches saines, et constitue donc un bon modèle d'étude pour cette question.

Grâce au savoir-faire de mon laboratoire d'accueil sur les cultures primaires de cellules-souches neurales, j'ai pu développer facilement d'après la littérature un modèle de culture cellulaire de CS de prostate qui est directement inspiré du « test des neurosphères » : la culture de prostasphères. Les résultats obtenus avec cette approche *in vitro* indiquent que l'agoniste ghrélinergique JMV-2894 stimule, non seulement l'autorenouveaulement des cellules-souches d'épithélium prostatique, mais aussi la prolifération basale de celles-ci. La caractérisation de cet effet demande à être complétée, mais les présents résultats indiquent d'ores et déjà que l'utilisation de la ghréline pour redonner l'appétit aux patients cancéreux présenterait des risques majeurs pour la santé de ceux-ci.

Dans la même inspiration, nous avons réalisés une étude de génétique humaine visant à rechercher si le CaP est associé significativement à des mutations des gènes de la ghréline et/ou de son récepteur.

## **DEUXIEME PARTIE**

La mesure des taux plasmatiques de PSA reste le standard actuel pour diagnostiquer le CaP (Brayet al 2018). Malheureusement, le PSA présente des limites, puisque des conditions non tumorales telles que infections et inflammations, peuvent également augmenter les taux de PSA (Feigelson et al 2014). Par conséquent, de nombreuses biopsies inutiles sont réalisées, ce qui entraîne des effets indésirables pour les patients et une augmentation des coûts publics. Dans ce cas, des efforts ont été orientés à l'identification de nouveaux biomarqueurs qui pourraient compléter ou même remplacer le PSA plasmatique afin d'améliorer le diagnostic du CaP (Hicks et al 2013). Ainsi, plusieurs facteurs endocriniens/métaboliques tels que certains composants du système ghréline, ont été associés au CaP (Cassoni et al 2004) ; toutefois, leur utilité potentielle en tant que biomarqueurs dans le CaP n'a pas été établie (Chopin et al 2012 ; Travis et al 2016).

Le système de la ghréline comprend un réseau pléiotrope et complexe composé de plusieurs peptides, y compris la ghréline native et l'In1-ghréline (Gahete et al 2014), et de récepteurs (GHS-R1a/b), impliqués dans la régulation de multiples processus physiopathologiques (Muller et al 2015). Depuis la première publication rapportant l'effet

antiprolifératif de la ghréline, de nombreuses études sur le cancer suggèrent un rôle pour le système ghréline/GHSR dans diverses tumeurs, modulant la prolifération, l'apoptose et les métastases (Götz et Probstmeier 2012 , Lin et al 2015 , Kraus et al 2016 , Villarreal et al 2022). Toutefois, plusieurs études ont montré que la ghréline avait des effets à la fois antiprolifératifs (Cassoni et al 2001 , Cassoni et al 2004 , Barzon et al 2005) et prolifératifs (Duxbury et al 2003 , Kim et al 2005 , Yeh et al 2005) sur diverses lignées cancéreuses. Des associations intéressantes entre la ghréline et les maladies néoplasiques ont été mise en évidence, telles que l'augmentation des taux de ghréline chez les patients atteints de cancer par rapport aux témoins non cancéreux appariés selon le sexe (Garcia et al 2006 , Spiridon et al 2021), la résistance à la ghréline dans le traitement de l'anorexie chez les souris porteuses de tumeurs (Wang et al 2006) et l'implication de l'axe ghréline/GHSR dans l'invasion et la migration de certaines cellules cancéreuses (Duxbury et al 2003 , Dixit et al 2006). La ghréline et le GHS-R sont importants dans le contexte de la pathologie du CaP. Les carcinomes prostatiques humains et les néoplasmes bénins expriment le messenger de la ghréline et du GHS-R. Cependant, dans le tissu prostatique normal, l'expression de la ghréline est indétectable, ce qui suggère que la ghréline est impliquée dans le CaP (Cassoni et al 2004 , Villarreal et al 2022).

Certaines études ont montré une association nulle ou inverse entre la ghréline et le risque/la progression de la plupart des cancers (Sever et al 2016), soulignant les controverses entre leurs conclusions et des études précédentes. Gahete et al (2014) ont inclus des données provenant d'études *in vitro* et cliniques. Ces auteurs ont souligné l'expression différentielle des récepteurs de la ghréline comme explication potentielle du rôle controversé de la ghréline dans différents cancers.

Plusieurs polymorphismes de la ghréline et de son récepteur ont été décrits, particulièrement dans le cas du diabète (Garcia et al 2009 , Liao et al 2013), l'obésité (Gjesing et al 2010), les désordres métaboliques (Ukkola 2011 , Mora et al 2015), les maladies cardiovasculaires (Berthold et al 2010), l'hépatite (Hamdy et al 2018), l'anorexie – cachexie (Blum et al 2021) et l'alcoolisme (Landgren et al 2008 et 2011).

Les polymorphismes de la ghréline les plus étudiés à ce jour sont situés. Au niveau du promoteur et dans les zones codantes du gène; certains d'entre eux ont des implications sur l'activité du gène (Garcia et al 2009). Les SNPs faux-sens dans le gène de la pré-proghréline

(*GHRL*) les plus étudiés à ce jour sont rs34911341/Arg51Gln, rs4684677/Gln90Leu et rs696217/Leu72Met. Parmi ces SNPs, 269A > T, une mutation qui provoque le changement Gln90Leu dans la prépro-ghréline, a été décrite comme étant associée à la maladie d'Alzheimer dans une étude cas-témoins japonaise (Shibata et al 2011). D'autres études ont apporté des preuves du rôle du polymorphisme rs4684677 T/A dans l'influence du syndrome métabolique, le trouble de panique, le cancer et les maladies thyroïdiennes auto-immunes (Steinle et al 2005 , Hansson et al 2013 , Pabalan et al 2014 , Moniuszko et al 2015).

À ce jour, les progrès dans notre compréhension de l'association des variants alléliques de la ghréline et de son récepteur avec le cancer ont été orientés principalement vers le cancer de l'œsophage (Doecke et al 2008), le cancer colorectal (Campa et al., 2010 ; Kasprzak, 2022), le cancer du sein (Dossus et al 2008) et le lymphome non hodgkinien (Skibola et al 2005). Très peu d'études ont examiné l'association des polymorphismes *GHRL* et *GHS-R* avec le risque de CaP (Noel et al 2014).

Le but de ce travail a été d'étudier l'association des SNPs des gènes *GHRL* et *GHS-R*, qui participent à une même fonction biologique, avec le risque du CaP dans un groupe d'individus algériens afin d'investiguer des facteurs prédictifs (biomarqueurs), qui seraient potentiellement utilisables dans le diagnostic, le pronostic et la prise en charge des patients. Nous avons également vérifié si ces SNPs étaient liés à l'IMC ; l'importance de ces polymorphismes ayant déjà été démontrée dans plusieurs types de cancer.

D'après les données de la bibliographie, il s'agit de la première étude réalisée avec 3 SNPs (rs696217, rs4684677 et rs34911341) dans le gène *GHRL* et 3 SNPs (rs2948694, rs572169 et rs2922126) dans le gène *GHS-R* dans le cas du CaP.

Tous les SNPs ont été génotypés à l'aide de la discrimination allélique TaqMan.

Cette étude a permis de mettre en évidence une anomalie de répartition des variants alléliques de la ghréline (rs696217) et de son récepteur (rs2922126 et rs572169) chez les patients atteints de CaP; les taux respectifs de ces allèles diffèrent de la loi de Hardy Weinberg. Ceci serait dû à un faible taux des hétérozygotes parmi les individus étudiés.

Dans le cas de la ghréline, la fréquence des homozygotes est supérieure à celle des hétérozygotes, contrairement au récepteur de la ghréline dont la fréquence des hétérozygotes est supérieure à celle des homozygotes pour les deux variants rs2922126 et rs572169. Le

génotype AG pour les variants rs4684677 et rs2948694, présente une différence très nettement marquée puisque sa fréquence est de 0,009 et 0,076 respectivement.

D'autre part, notre étude a montré que le génotype hétérozygote CT pour le polymorphisme *GHRL* rs34911341 est absent aussi bien chez les témoins que chez les malades. Il s'agit d'un génotype très rare. Ce résultat corrobore celui trouvé par Zhang et al (2015) qui ont montré que parmi une cohorte de 600 sujets, un seul sujet présentait le génotype CT pour le polymorphisme *GHRL* rs34911341.

Les courbes de survie globale pour la survenue de décès des patients CaP selon les génotypes montre une diminution non significative ( $p > 0,05$ ) de la survie globale associée aux variants *GHRL* (rs696217) et *GHS-R* (rs2922126 et rs572169). Un fait remarquable est que les individus homozygotes présentent un taux de survie faible contrairement aux individus hétérozygotes qui pourraient être en relation avec une meilleure survie. Chez les porteurs de l'allèle T, il semble exister une meilleure survie des patients. En revanche les haplotypes du gène *GHS-R* ne semblent pas avoir de conséquences sur le CaP. Les associations avec les allèles peuvent être dues au hasard, refléter le fait que l'allèle est fonctionnel, être dues au fait que l'allèle est un facteur de risque ou peuvent être causé par l'allèle qui n'a pas été identifié et qui influence le phénotype (Liu et al 2011).

Cette étude basée sur l'exploration de 6 SNPs est la première à apporter de nouvelles preuves que le gène de la ghréline ainsi que son récepteur ne sont pas associés au CaP et indiquent que la ghréline n'augmente pas directement la progression du cancer dans les cellules de la prostate. Dans les cellules normales, la ghréline favorise la prolifération en stimulant les voies PI3K/AKT et MAPK (Wang et al 2016), et augmente également la résistance à l'apoptose (Zhang et al 2011). La différence de prolifération cellulaire et de résistance à l'apoptose entre les cellules normales et les cellules cancéreuses peut être en partie due à des différences dans le niveau d'expression du *GHS-R*.

Le modèle de DL est principalement déterminé par la distance physique entre les marqueurs, bien que plusieurs autres facteurs démographiques et évolutifs, notamment la stratification de la population, la consanguinité, l'effective de la population, la migration, la mutation, la sélection et le taux de recombinaison, peuvent également influencer la portée et le profil du DL (Reich et al 2001 , Ardlie et al 2002).

Dans notre étude, l'analyse du DL initiale a révélé un bloc DL composé de deux SNPs dans la région du gène *GHS-R* (rs2922126/rs572169) et deux SNPs dans la région du gène *GHRL* (rs696217/rs4684677). Ceci implique la présence d'un DL autour des différents loci qui affectent conjointement les polymorphismes du gène de la ghréline. Des variants fonctionnels pourraient se situer dans les gènes *GHRL* et *GHS-R* ou dans d'autres gènes autour de ces loci, de manière indépendante ou synergique, et exercer un risque accru de CaP. Ainsi, la sélection d'un sous-ensemble informatif de SNPs communs à utiliser dans les études

d'association est nécessaire pour obtenir une puissance suffisante afin d'évaluer le rôle causal des variations communes de l'ADN dans des situations pathologiques complexes. Des études portant sur des échantillons de plus grande taille et portant sur des populations différentes sont nécessaires pour obtenir un aperçu détaillé du lien entre les variations génétiques dans cette région et le CaP.

D'autre part, bien que nous n'ayons pas étudié les causes des mutations sur les gènes *GHRL/GHS-R*, plusieurs études ont rapporté l'impact des mutations sur l'expression des gènes (Fleck et al 2016 , Jia et Zhao 2017).

Nous avons également décrit la relation des 6 SNPs avec le phénotype quantitatif IMC dans la population étudiée. La cachexie chez les cancéreux âgés est un problème de santé publique qu'il convient d'anticiper, de diagnostiquer rapidement et de prendre en charge efficacement. Cependant, cette condition n'est pas souvent prise en compte dans la pratique clinique, et les facteurs de risque spécifiques n'ont pas encore été bien caractérisés (Poisson et al 2021). Les résultats de notre travail ont montré une différence significative ( $p < 0,0001$ ) entre les 3 groupes d'IMC ( $<18,50$  ;  $18,50 - 25$  ;  $>25$  kg/m<sup>3</sup>) et les génotypes analysés. Plus précisément, nous avons observé, aussi bien pour les SNPs *GHRL* que *GHS-R*, qu'un IMC  $< 18,5$  kg/m<sup>3</sup> était retrouvé chez 9 sur 13 malades présentant des caractéristiques d'agressivité du cancer. Du point de vue métastatique, 10 malades sur 22 présentent des métastases osseuses. De manière cohérente, les cancers non agressifs présentaient un nombre plus élevé de patients avec un IMC  $> 18,50$  kg/m<sup>3</sup>.

Une étude (Poisson et al 2021) a montré que sur 81 malades atteints du CaP, 49,38%, présentaient un état non cachectique, alors que 50,61% des malades étaient cachectiques. Les patients qui étaient plus susceptibles de souffrir de cachexie sont particulièrement les patients hospitalisés et ceux présentant des métastases. Cependant, la cachexie était significativement non associée à la mortalité à 6 mois observée pour les autres cas de cancer (Tractus digestif, pancréas, foie, poumons et leucémie).

Les résultats controversés de la relation du CaP et de l'IMC sont rapportés par certains auteurs. Bien que le lien de l'obésité et l'incidence du CaP est complexe et, à bien des égards, peu claire (Freedland et al 2010), des rapports antérieurs ont montré que la mortalité liée au cancer de la prostate augmentait avec un IMC plus élevé (Calle et al 2003 , Rodriguez et al 2001). L'association d'un IMC élevé à une incidence accrue de CaP agressif suggère qu'un IMC élevé peut contribuer à la production d'hormones et à l'activation de la synthèse du cholestérol et des voies inflammatoires, affectant la croissance du CaP (Kaaks et Stattin 2010). Dans une population saoudienne, Salem Al-Nbaheen (2023) a montré une association significative entre les SNPs rs696217 et rs34911341 du gène *GHRL* et l'IMC chez des personnes âgées obèses.

La malnutrition est fréquente chez les patients atteints de cancer ; elle peut résulter de la tumeur elle-même mais aussi du traitement médical ou chirurgical. Selon la Société européenne de nutrition parentérale et entérale (ESPEN), 10 à 20 % des patients atteints de cancer meurent des conséquences de la malnutrition plutôt que de la tumeur elle-même, car la malnutrition affecte la tolérance et la réponse au traitement. Dans ce contexte, un dépistage nutritionnel approprié doit être réalisé au moment du diagnostic et au cours du suivi afin d'établir des stratégies nutritionnelles thérapeutiques appropriées (Muscaritoli et al 2021). La ghréline joue un rôle dans la régulation de l'équilibre énergétique, l'appétit (Lin et Hsiao 2017). Dans ce contexte, le système de la ghréline pourrait jouer un rôle important dans la régulation des processus liés au cancer (Luque 2015 , Hormaechea-Agulla 2016 , Herrera-Martínez et al 2017) et dans l'antagonisme de la dégradation des protéines dans les conditions cataboliques de la cachexie cancéreuse (Sever et al 2016). Ces diverses actions suggèrent qu'il peut perturber le cercle vicieux de la cachexie grâce à ses effets anaboliques, orexigènes et anti-inflammatoires. Dans les tumeurs solides, la perte de poids a été associée à une augmentation de la mortalité, indépendamment de l'âge, de la race et du stade de la tumeur (Nguyen et Yueh 2002 , Gannavarapu et al 2018 , Shang et al 2021). En évaluant les chances de survie et le risque de décès de nos patients, les résultats ont montré une survie significativement plus faible ( $p = 0,026$ ) chez les patients présentant un IMC  $< 18,50 \text{ kg/m}^3$ . Nous avons trouvé que les âges médians des patients présentant un IMC  $> 18,50 \text{ kg/m}^3$  étaient plus élevés (54 mois) que ceux des patients présentant un IMC  $\leq 18,50 \text{ kg/m}^3$  (47 mois). Dans le groupe métastatique, la progression de la maladie serait plus courte, ce qui entraîne une rechute plus rapide entraînant souvent une maigreur accentuée des malades.

La cachexie cancéreuse est un syndrome insidieux paranéoplasique multifactoriel qui se caractérise par une inflammation systémique, un équilibre protéino-énergétique négatif et une fonte progressive des muscles squelettiques avec réduction du poids corporel. On estime que la moitié des patients atteints de cancer avancé finissent par développer un syndrome de cachexie. Ils présentent souvent des troubles du métabolisme de base ainsi qu'une diminution de l'appétit et de la prise alimentaire, une mauvaise réponse thérapeutique, une baisse de la qualité de vie et une diminution de la survie. L'état cachectique ne peut pas être totalement inversé. Actuellement, tous les traitements de la cachexie cancéreuse sont considérés comme palliatifs, mais de nouveaux agents ont amélioré la survie des patients ainsi que leur qualité de vie. Les agents anti-néoplasiques habituels ont la capacité de traiter le cancer, mais dans de nombreux cas, ils aggravent la cachexie (Staal-van den Brekel et al 1995 , Tisdale 2009 , Blum et al 2011 , Tomoyoshi et al 2015). Dans le cas de l' d'adénocarcinome pulmonaire, Tsubouchi et al (2017) suggèrent que la ghréline représente un agent prometteur pour le traitement sûr de la cachexie cancéreuse sans favoriser la progression du cancer. Toutefois, la cachexie cancéreuse reste difficile à prendre en charge.

Une étude récente (Zeng et al 2020) portant sur les effets thérapeutiques de l'AG et de l'UAG dans un modèle a montré que l'administration de la ghréline acylée (AG) et non acylée (UAG) améliorait l'état nutritionnel et inverse partiellement les effets de la cachexie musculaire. Il est intéressant de noter que lorsque l'AG et UAG étaient administrés aux souris, l'activation des processus de dégradation du myofilament ont été inhibés, ce qui suggère que l'AG et l'UAG ont le potentiel d'améliorer la cachexie due au cancer. Chez les personnes atteintes de cachexie cancéreuse soumises à une chimioradiothérapie, les niveaux de ghréline et le poids corporel global semblent diminuer de manière significative (Uysal et al 2020). Cela suggère que pendant ces traitements, les thérapies ciblant les niveaux de ghréline peuvent être bénéfiques pour diminuer les effets négatifs de la cachexie (Kotta et al 2022).

Lorsque nous évaluons les polymorphismes individuellement, nous observons que l'effet est relativement faible pour être détecté comme statistiquement significatif avec notre taille d'échantillon. Cependant, lorsque les polymorphismes sont analysés de manière combinée par la méthode de réduction de la dimensionnalité multifactorielle (MDR), une interaction significative peut être identifiée puisque l'effet combiné des polymorphismes est plus fort. D'autre part, son l'intérêt réside dans le fait que le risque de maladie dépend de la combinaison particulière de génotypes hérités. La méthode MDR a été la première approche

unique spécifiquement développée dans le cadre d'études de maladies humaines basées sur la population afin d'identifier et de classer les interactions génétiques non additives. Ritchie et al. ont défini la version originale de la méthode MDR en 2001 pour identifier les interactions de SNP associées à des données sur le cancer du sein (Ritchie et al 2001 , Manavalan et Priya 2021).

L'identification des liaisons entre les multiples variants et les facteurs environnementaux est un défi important dans l'élucidation de l'étiologie des maladies courantes comme l'hypertension, la maladie d'Alzheimer et le cancer qui seraient d'origine multifactorielle, causées par des variants génétiques à plusieurs locus, chaque locus conférant un risque modeste d'avoir la maladie (Ritchie et al 2001 , Moore et Williams 2002 , Nagel 2005). Des interactions multiples et complexes sous-tendent l'expression et la régulation des gènes, et il est prouvé que les interactions gène-gène et gène-environnement intervient dans la détermination des phénotypes des pathologies courantes (Kardia 2000 , Templeton, 2000). Souvent, les données SNPs sont analysées à l'aide de méthodes à locus unique (Herbert et al 2006 , Lambert et al 2009). Les loci qui interagissent de manière complexe peuvent ne pas être facilement détectés avec de telles méthodes (Marchini et al 2005).

Il est difficile de détecter statistiquement les relations épistatiques en raison de la rareté des données et de la non-linéarité des relations (Velez et al 2007). De nouvelles méthodes statistiques et informatiques ont été développées pour identifier et caractériser les interactions épistatiques. Les méthodes paramétriques comprennent la régression logistique (Millstein et al 2005) et les méthodes non paramétriques basées sur l'apprentissage automatique comprennent les méthodes combinatoires, l'analyse d'association d'ensembles, la programmation génétique, les réseaux neuraux (neural networks) et les forêts aléatoires (random forests) (Heidema et al 2006). Les méthodes combinatoires examinent toutes les combinaisons possibles de loci afin d'identifier les combinaisons de SNPs qui sont prédictives d'un paramètre clinique discret. Une combinaison particulière de SNPs qui, associée à la bonne fonction non linéaire, constitue un prédicteur significatif de la susceptibilité à la maladie. La méthode MDR (Hahn et al 2003 , Velez et al 2007) a été conçue pour détecter les associations entre plusieurs marqueurs génétiques et un phénotype en examinant les interactions d'ordre supérieur entre les SNPs dans un contexte cas-témoins. La MDR recherche un grand volume de données SNPs afin d'identifier une combinaison

d'attributs liés aux maladies cancéreuses en réduisant le nombre d'individus mal classés. Elle combine deux variables ou plus en une seule variable (ce qui entraîne une réduction de la dimensionnalité); cela modifie l'espace de représentation des données et facilite la détection d'interactions non linéaires entre les variables (Jiang et al 2010 , Manavalan et Priya 2021).

Dans cette étude, nous avons réalisé pour la première fois une approche d'exploration de données MDR afin de détecter les interactions gène-gène et gène-environnement de 6 SNPs des gènes *GHRL/GHS-R* dans le cas du CaP. À notre connaissance, il s'agit du premier rapport sur l'effet d'interaction de l'IMC et le polymorphisme des gènes *GHRL* et *GHS-R* chez les malades CaP analysé par MDR.

La MDR est une approche d'exploration de données et d'apprentissage automatique qui suppose des méthodes non paramétriques et sans modèle d'estimation des interactions non linéaires avec peu de faux-positifs, même sur des échantillons relativement petits. La compréhension du rôle des séquences d'ADN dans la susceptibilité aux maladies est donc en mesure d'améliorer le diagnostic, la prévention et le traitement. La validation des modèles par des tests de permutation et les probabilités de rapport de faux positifs ont également été effectuées pour surmonter l'estimation inexacte. Des graphiques d'entropie d'interaction ont été construits pour interpréter les effets de combinaison identifiés par la MDR.

Il existe deux types d'épistasie, biologique et statistique. L'épistasie biologique résulte d'interactions physiques entre des biomolécules (ADN, ARN, protéines, enzymes, etc...) et se produit au niveau cellulaire chez un individu. L'épistasie statistique, quant à elle, se produit au niveau de la population et est réalisée lorsqu'il y a une variation interindividuelle dans les séquences d'ADN (Moore et Williams 2005). Ainsi, notre étude porte sur la détection et la caractérisation de l'épistasie statistique dans une population de malades atteints du CaP, à l'aide de la MDR qui a été développée spécifiquement pour ce domaine.

L'analyse MDR a montré une interaction épistatique potentielle entre les SNPs rs572169, rs2922126. Cette combinaison sur la susceptibilité au CaP a mis en évidence le meilleur modèle qui comprenait des valeurs de la précision de l'équilibre d'apprentissage et de la précision de l'équilibre de test et la CVC la plus élevée. Ainsi, notre étude a révélé une interaction significative ( $p = 0,0107$ ) entre les polymorphismes rs572169, rs2922126, avec un CVC de 10 et une valeur d'entropie de 6,87%. Le modèle MDR 2 loci était, ainsi, le meilleur prédicteur de risque chez les malades CaP. Des génotypes ont été identifiés entre ces deux polymorphismes. Ce modèle combiné confère un risque de CaP, mais individuellement, ces SNPs ne présentent aucun effet.

Pour l'interaction *GHRL-IMC*, le modèle rs4684677, rs34911341, IMC est le meilleur parmi les facteurs inclus. Ce modèle avait une précision maximale du test équilibré de 0,5345, une CVC de 10/10 et une valeur *p* significative de 0,0019.

Pour l'interaction *GHS-R/IMC*, Le modèle rs572169, rs2922126, rs2948694, IMC est le meilleur parmi les facteurs inclus. Ce modèle avait une précision maximale du test équilibré de 0,6298, une CVC de 10/10 et une valeur *p* significative de 0,0386.

Dans les interactions gène-gène et gènes-environnement, la force de la liaison est basée sur les niveaux d'entropie. Un pourcentage positif d'entropie dénote une interaction synergique tandis qu'un pourcentage négatif dénote une redondance.

Dans le cas de l'interaction gène-gène de notre étude, l'ordre de force de l'association des variables est le suivant : rs2922126 > rs696217 > rs34911341 > rs572169 > rs4684677. Une forte interaction synergique (entropie: 6,87 %) a été observée entre rs2922126 et rs572169. Une forte redondance est observée entre rs2922126 et rs34911341.

Dans le cas de l'interaction *GHRL-IMC*, l'ordre de force de l'association des variables est le suivant: IMC > rs34911341 > rs696217 > rs4684677. Une faible interaction synergique (entropie: 1,33 %) a été observée entre rs4684677 et rs34911341, tandis que l'IMC contrebalance le risque associé à rs4684677 (entropie: - 0,93 %), à rs34911341 (entropie: - 0,68%) et à rs696217 (entropie: -2,83%).

Dans le cas de l'interaction *GHS-R/IMC*, l'ordre de force de l'association des variables est le suivant : IMC > rs572169 > rs9 rs29486944 > rs2922126. Une interaction synergique (entropie: 0,37%) a été observée entre rs572169 et rs2922126, tandis que l'IMC contrebalance le risque associé à rs2948694 (entropie: - 0,21 %), à rs2922126 (entropie: -0,26%) et à rs572169 (entropie: -3,11%). Une forte synergie (épistasie) est observée entre rs572169 et rs2922126 (entropie: 3,76%) et rs2922126 et rs2948694 (entropie: 2,93%). Entre rs572169 et rs2948694 il existe une faible synergie.

Ces résultats ont permis d'identifier les interactions gène-gène et gène-environnement distinctes chez les malades du CaP, ce qui confirme l'importance des interactions multifactorielles dans l'évaluation du risque.

La méthode MDR a été appliquée avec succès à la détection d'épistasie ou d'interactions gène-gène pour une variété de maladies humaines complexes, y compris certains cancers avec des

localisations cancéreuses différentes. Dans une revue de la bibliographie publiée par (Manavalan et Priya 2021), plusieurs travaux réalisés sur l'application de la MDR pour l'analyse des interactions gène-gène sont cités. Ainsi, Manuguerra et al (2006) ont appliqué la MDR pour détecter des variants génétiques associés à divers cancers et à des variables environnementales telles que le tabagisme et la pollution atmosphérique chez des patients atteints de leucémie myéloïde, de cancer de la vessie et de cancer du poumon. Le meilleur modèle d'interaction a été obtenu pour le cancer du poumon entre la variable environnementale et les gènes étudiés, *XRCCI\_28152*, et *BRCA2* avec une erreur de prédiction de 0,74 et un CVC de 6,60. Dans le cas du cancer de la vessie, le modèle à 4 locus (*APE1*, *RAD52*, *COMT* et *MTHFR*) a produit une erreur de prédiction de 0,78 avec un CVC de 6,60. de 0,78 avec un CVC de 7,40. Dans le cas du cancer de la vessie, le modèle à 4 locus (*APE1*, *RAD52*, *COMT* et *MTHFR*) a produit une erreur de prédiction de 0,78 avec une CVC de 7,40. Dans la leucémie, le modèle à 3 locus (*RAD52*, *MnSOD* et *CYP1A1*) a produit une erreur de prédiction de 0,69 et une CVC de 4,40. Milne et al. (2008) ont introduit la MDR dans les études cas-témoins sur le cancer du sein dans les populations espagnole et finlandaise. La MDR a montré une interaction quadruple dans la voie du récepteur des cellules B entre les SNP rs40419, rs2267922, rs2498804, et rs93059 avec une précision de test variant de 56 à 58%. Landa et al (2013) ont appliqué la MDR basé pour identifier l'interaction dans un ensemble de données sur le cancer de la thyroïde papillaire. Ces auteurs ont trouvé une interaction significative entre rs721992 et rs6554198. Mostowska et al (2013) ont réalisé la MDR sur 11 gènes *DNMT1*, *DNMT3A* et *DNMT3B* afin d'identifier le risque de cancer de l'ovaire par le biais d'interactions génétiques. La MDR a identifié les meilleures combinaisons de SNP rs759920, rs2289195, et rs7590760 et rs2424932 avec une précision équilibrée de 59,03 %. Marcus et al. (2016) ont appliqué la MDR pour prédire le cancer du poumon par le biais d'interactions épistatiques. La MDR a trouvé 5 SNPs liés au cancer du poumon, dont trois SNPs tels que rs1799732, rs5744256, et rs2306022 des gènes *DRD2*, *IL-18* et *ITGAI1* ont été choisis comme étant les mieux associés au cancer du poumon.

Il convient de souligner les limites de cette étude; i) ce travail a été réalisée dans un seul centre de recrutement. ii) Le nombre de sujets ayant été inclus a été limité aux possibilités de recrutement dans une seule zone géographique. Des études représentatives de populations plus nombreuses et plus diversifiées sont nécessaires si l'on veut que la médecine et la prévention de précision s'appliquent à l'ensemble de la population. iii) Une plus grande puissance statistique aurait probablement été possible avec un plus grand nombre de

participants, en particulier pour les polymorphismes de faible fréquence. iv) Notre étude n'a pas inclus les sujets ayant subi une prostatectomie.

**En conclusion**, nous avons analysé les polymorphismes des gènes *GHRL/GHS-R* liés au CaP chez des patients algériens et n'avons pas trouvé d'associations de susceptibilité génétique significatives entre les variants alléliques étudiés et le CaP. Nos résultats révèlent également l'absence d'association entre les haplotypes et le CaP. Les résultats suggèrent que le génotype TT du SNP rs2922126 serait associé au CaP dans la population étudiée et pourrait être un génotype de susceptibilité au CaP et servir d'indice prédictif important pour l'évolution clinique et le pronostic du CaP.

L'analyse de Kaplan-Meier montre une diminution non significative ( $p > 0,05$ ) de la survie globale associée aux variants *GHRL* (rs696217) et *GHS-R* (rs2922126 et rs572169).

D'autre part, nous avons identifié une différence statistiquement significative ( $p < 0,0001$ ) concernant l'âge dans les groupes classés selon l'IMC. La cachexie était significativement liée aux métastases et à un âge médian de survie à 47 mois après le diagnostic. Toutefois, il s'agit de la première étude épidémiologique identifiant la relation complexe entre les polymorphismes génétiques *GHRL/GHS-R* et l'IMC dans la population étudiée. D'autres études portant sur de grands échantillons dans des populations indépendantes sont justifiées pour valider les résultats de cette étude. Les études futures évalueront l'influence de l'IMC sur la mortalité des patients atteints de cancer de la prostate.

Les études sur les patients atteints de CaP devraient être stratifiées par type de cancer, avec des variables confondantes bien contrôlées, notamment la durée de la maladie et la durée de l'hospitalisation, le traitement et le mode de vie.

Lorsque nous évaluons les polymorphismes individuellement, nous observons que l'effet est relativement faible pour être détecté comme statistiquement significatif avec notre taille d'échantillon ; cependant, lorsque les polymorphismes sont analysés de manière combinée par la méthode MDR, une interaction significative peut être identifiée puisque l'effet combiné des deux polymorphismes est plus fort. L'analyse de l'épistasie peut constituer un excellent outil pour identifier les individus à haut risque.

L'effet de l'interaction gène-gène entre les polymorphismes rs2922126 et rs572169 et l'interaction gène-environnement entre les polymorphismes rs4684677, rs34911341, IMC et rs572169, rs2922126, rs2948694, IMC semble jouer un rôle important dans la pathogenèse du CaP; l'analyse de l'épistasie peut donc constituer un excellent outil pour identifier les individus présentant un risque élevé de développer un CaP.

## **Perspectives**

- Dans la mesure où les altérations germinales et somatiques peuvent différer dans les deux phénotypes cliniques, d'autres études sont nécessaires pour délimiter les altérations germinales et somatiques dans les maladies indolentes et agressives du CaP.
- L'étude actuelle n'a porté que sur six SNPs des gènes *GHRL/GHS-R*. Il serait intéressant d'identifier davantage de polymorphismes SNPs et d'étudier leur association avec la maladie.
- Cette étude s'est intéressée à l'aspect génétique; les niveaux de ghréline n'ont pas été évalués. Par conséquent, l'interaction entre les SNPs du gène de la ghréline et les niveaux de son expression sérique avec le risque du CaP n'a pas pu être estimée. Les niveaux circulants des composants du système de la ghréline pourraient fournir des informations supplémentaires, étant donné que ces cibles moléculaires, en particulier le GOAT, pourraient représenter des marqueurs pronostiques putatifs pour le CaP.
- L'utilisation de blocs de DL peut être une perspective intéressante pour explorer la présence d'interactions dans des régions génomiques plus vastes, étant donné que les blocs LD peuvent comprendre plusieurs gènes. La prise en compte des blocs de DL permettrait de regrouper les gènes corrélés dans un ensemble unique et de prendre en compte les SNPs qui sont situés dans les régions intergéniques.

## **Références bibliographiques**

Abdalla MMI (2015) Ghrelin – Physiological functions and regulation. *Eur Endocrinol* 11(2):90-95.

Affinati AH, Myers MGJr (2021) Neuroendocrine control of body energy homeostasis. *Livre MDText.com*.

Akamizu T, Shinomiya T, Irako T, Fukunaga M, Nakai Y, Kangawa K (2005) Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6-9.

Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult Mammals? *Science* 135:1127-8.

Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137(4):433-57.

Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124(3):319-35.

Aoyagi T, Terracina KP, Raza A, Matsubara H, Takabe K (2015) Cancer cachexia, mechanism and treatment. *World J Gastrointest Oncol*. 7(4): 17–29.

Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M (2002) Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet* 3(4):299-309.

Baracos VE, Martin L, Korc M, Guttridge DC, Fearon KHC (2018) Cancer-associated cachexia. *Nat Rev Dis Primers* 18:17105.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005 Jan 15;21(2):263-265.

Barzon L, Pacenti M, Masi G, Stefani AL, Fincati K, Palù G (2005) Loss of growth hormone secretagogue receptor 1a and overexpression of type 1b receptor transcripts in human adrenocortical tumors. *Oncology* 68, 414–421

Bauer S, Hay M, Amilhon B, Jean A, Moysé E (2005) In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience* 130(1):75-90.

Bedard P, Hansen A, Ratain M, Siu L (2013) Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature* 501(7467):355- 64.

Ben Dhaou C, Terrié E, Déliot N, Harnois T, Cousin L, Arnault P, Constantin B, Moysé E, Coronas V (2023) Neural stem cell self-renewal stimulation by store-operated calcium entries in adult mouse area postrema: influence of leptin. *Front Cell Neurosci*, 17 :1200360. doi 10.3389/ fncel.2023.1200360.

Berthold HK, Giannakidou E, Krone W, Tregouet DA, Gouni-Berthold I (2010) Influence of ghrelin gene polymorphisms on hypertension and atherosclerotic disease. *Hypertens Res* 33:155–60.

Berthoud HR, Albaugh VL, Neuhuber WL (2021) Gut-brain communication and obesity: understanding functions of the vagus nerve. *J Clin Invest* 131(10):143770.

Bluet-Pajot MT, Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, Grouselle D, and Epelbaum J (2005) La ghreline, un exemple saisissant de pléiotropie des peptides neuroendocriniens. *Médecine/sciences* 21:715-21.

Blum D, Omlin A, Baracos VE, Solheim TS, Tan BH, Stone P, Kaasa S, Fearon K, Strasser F (2011) Cancer cachexia: a systematic literature review of items and domains associated with involuntary weight loss in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 80:114–44.

Blum D, Wolf-Linder S., Oberholzer R., Brändle M., Hundsberger T, Strasser F (2021) Natural ghrelin in advanced cancer patients with cachexia, a case series. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 12:506–16.

Bowers CY, Chang J, Momany FA, et al (1977) Effects of enkephalins and enkephalins analogs on release of pituitary hormones *in vitro*. *Molecular endocrinology* 287-92.

Bowers CY, Sartor AO, Reynolds BA, and Badger TM (1991) On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP. *Endocrinology* 128:2027–2035.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68(6):394-424.

Bresciani E, Rizzi L, Molteni L, Ravelli M, Liantonio A, Ben Haj Salah K, Fehrentz JA, Martinez J, Omeljaniuk RJ, Biagini G, Locatelli V, Torsello A (2017) JMV2894, a novel growth hormone secretagogue, accelerates body mass recovery in an experimental model of cachexia. *Endocrine* 58(1):106-114.

Broglio F, Arvat E, Benso A, et al. (2002) Endocrine activities of cortistatin-14 and its interaction with GHRH and ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3783–90.

Buettner R, Wolf J, Thomas RK (2013) Lessons learned from lung cancer genomics: The emerging concept of individualized diagnostics and treatment. *J Clin Oncol* 31(15):1858-65.

Buntwal L, Sassi M, Morgan AH, Andrews ZB, Davies JS (2019) Ghrelin-mediated hippocampal neurogenesis: implications for health and disease. *Trends Endocrinol Metab* 30(11):844-59.

Cahill SP, Hatchard T, Abizaid A, Holahan MR (2014) An examination of early neural and cognitive alterations in hippocampal-spatial function of ghrelin receptor-deficient rats. *Behav Brain Res* 264:105-15.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 348: 1625–38.

Campa D, Pardini B, Naccarati A, Vodickova L, Novotny J, Steinke V, Rahner N, Holinski-Feder E, Morak M, Schackert HK, Görgens H, Kötting J, Betz B, Kloor M, Engel C, Büttner R, Propping P, Försti A, Hemminki K, Barale R, Vodicka P, Canzian F (2010) Polymorphisms of genes coding for ghrelin and its receptor in relation to colorectal cancer risk: a two-step gene-wide case-control study. *Gastroenterology* 10:112.

Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J, Hieronymus H, Chen Y, Chandralapaty S, Arora VK, Le C, Koutcher J, Scher H, et al (2011) Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer. *Cancer Cell* 19:575-86.

Cassoni P, Allia E, Marrocco T, Ghe C, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M (2006) Ghreline et cortistatine dans le cancer du poumon : expression de peptides et de récepteurs apparentés dans les tumeurs primaires humaines et effet in vitro sur la lignée cellulaire de carcinome à petites cellules H345. *J. Endocrinol. Enquêteur* 29:781–790.

Cassoni P, Ghé C, Marrocco T, Tarabra E, Allia E, Catapano F, Deghenghi R et al. (2004) Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *Eur J Endocrinol* 150:173–84.

Cassoni P, Papotti M, Ghè C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, Deghenghi R et al. (2001) Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1738–45.

Chadloub N, Baker SJ (2009) PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* 4:127-50.

Charrier C, Coronas V, Fombonne J, Roger M, Jean A, Krantic S, Moyse E (2006) Characterization of neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat brainstem by in vivo proliferation labelling and in vitro neurosphere assay. *Neuroscience* 138(1):5-16.

Chartrel N, Alvear-Perez R, Leprince J, Iturrioz X, Goazigo ARL, Audinot V et al (2007) Comment on "Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin's Effects on Food Intake". *Science* pp 766c-766c.

Chigr F, Rachidi F, Segura S, Mahaut S, Tardivel C, Jean A, Najimi M, Moyse E (2009) Neurogenesis inhibition by chronic immobilization stress in the dorsal vagal complex of adult rat. *Neuroscience* 158:524-36.

Chopin LK, Seim I, Walpole CM, Herngton AC (2012). The ghrelin axis: does it have an appetite for cancer progression? *Endocr Rev* 33(6):849-91.

Chung H, Li E, Kim Y, Kim S, Park S (2013) Multiple signaling pathways mediate ghrelin-induced proliferation of hippocampal neural stem cells. *J Endocrinol* 218(1):49-59.

Chung H, Park S (2016) Ghrelin regulates cell cycle-related gene expression in cultured hippocampal neural stem cells. *J Endocrinol* 230(2):239-50.

Costa JL, Naot D, Lin JM, Watson M, Callon KE, Reid IR, Grey AB, Cornish J (2011) Ghrelin is an Osteoblast Mitogen and Increases Osteoclastic Bone Resorption In Vitro. *Int J Pept* 2011: 605193.

Conn PM, Bowers CY (1996) A new receptor for growth hormone-release peptide. *Science* 273:923.

Cooper AB, Slack R, Fogelman, D, *et al* (2015) Characterization of Anthropometric Changes that Occur During Neoadjuvant Therapy for Potentially Resectable Pancreatic Cancer. *Ann Surg Oncol* 22:2416–2423.

Crowley L, Shen MM (2022) Heterogeneity and complexity of the prostate epithelium: new findings from single-cell RNA sequencing studies. *Cancer Lett* 525:108-14.

Crowell PD, Fox JJ, Hashimoto T, Diaz JA, Navarro HI, Henry GH, Feldmar BA, Mowe MG, Garcia AJ, Wu YE, Sajed DP, Strand DW, Goldstein AS (2019) Expansion of luminal progenitor cells in the aging mouse and human prostate. *Cell Rep* 28(6):1499-510.

Cummings DE (2006) Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav* 89:71–84.

Cummings DE, Overduin J (2007) Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 117:13-23.

Davies JS (2022) Ghrelin-mediated hippocampal neurogenesis. *Vitam Horm* 118:337-67.

Diaz-Lezama N, Hernand Elvira M, Sandoval A, Monroy A, Felix R, Monjaraz E (2010) La ghréline inhibe la prolifération et augmente l'expression du canal  $Ca^{2+}$  de type T dans les cellules de carcinome de la prostate humain PC-3. *Biochim Biophys Res Commun* 403:24 – 9.

Dixit VD, Weeraratna AT, Yang H, Bertak D, CooperJenkins A, Riggins GJ, Eberhart CG, Taub DD (2006) Ghrelin and the growth hormone secretagogue receptor constitute a novel autocrine pathway in astrocytoma motility. *J Biol Chem* 281:16681–90.

Doecke JD, Zhao ZZ, Stark MS, Green AC, Hayward NK, Montgomery GW, Webb PM, Whiteman DC (2008) Single nucleotide polymorphisms in obesity related genes and the risk of esophageal cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(4):1007–12.

Dossus L., McKay J.D., Canzian F., Wilkening S., Rinaldi S., Biessy C., Olsen A., Tjønneland A., Jakobsen M.U., Overvad K., Clavel-Chapelon F., BoutronRuault M.C., Fournier A., Linseisen J., Lukanova A., Boeing H., Fisher E, Trichopoulou A., Georgila C., Trichopoulos D., Palli D., Krogh V., Tumino R., Vineis P., Ramon Quiros J., Sala N., Martinez-Garcı C., Dorronsoro M., Chirlaque M.D., Barricarte A., Van Duijnhoven F.J.B., Buenode-Mesquita H.B., Van Gils C.H., Peeters P.H.M., Hallmans G., Lenner P., Bingham S., Khaw K.T., Key T.J., Travis R.C., Ferrari P., Jenab M., Riboli E., Kaaks R. (2008) Polymorphisms of genes coding for ghrelin and its receptor in relation to anthropometry, circulating levels of IGF-I and IGFBP-3, and breast cancer risk: a case–control study nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Carcinogenesis* 29(7):1360-6.

Duxbury MS, Waseem T, Ito H, Robinson MK, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE (2003) Ghrelin promotes pancreatic adenocarcinoma cellular proliferation and invasiveness. *Biochem Biophys Res Commun* 309:464–8.

Espigolan R, Baldi F, Boligon AA, Souza FR, Gordo DG, Tonussi RL, et al. (2013) Study of whole genome linkage disequilibrium in Nellore cattle. *BMC genomics* 14:305. Doi: 10.1186/1471-2164-14-305 PMID: 23642139 3.

Evans GS, Chandler JA (1987) Cell proliferation studies in the rat prostate: II. The effects of castration and androgen-induced regeneration upon basal and secretory cell proliferation. *Prostate* 11:339-51.

Evron T, Peterson SM, Urs NM, Bai Y, Rochelle LK, Caron MG, Barak LS (2014) G Protein and  $\beta$ -arrestin signaling bias at the ghrelin receptor. *J Biol Chem* 289(48): 33442-55.

Feigelson HS, Goddard KA, Hollombe C, Tingle SR, Gillanders EM, Mechanic LE, Nelson SA (2014) Approaches to integrating germline and tumor genomic data in cancer research. *Carcinogenesis* 35(10):2157 –63.

Feighner SD, Howard AD, Prendergast K, Palyha OC, Hreniuk DL, Nargund R, Underwood D, Tata JR, Dean DC, Tan CP, McKee KK, Woods JW, Patchett AA, Smith RG and Van der Ploeg LH (1998) *Mol, Endocrinol* 12 (1) : 137-45.

Fernández-Torres J, Martínez-Nava GA, Zamudio-Cuevas Y, Martínez-Flores K, Espinosa-Morales R (2019) Epistasis between ADIPOQ rs1501299 and PON1 rs662 polymorphisms is potentially associated with the development of knee osteoarthritis. *Molecular Biology Reports* 46:2049–58.

Fleck JL, Pavel AB, Cassandras CG (2016) Integrating mutation and gene expression cross-sectional data to infer cancer progression. *BMC Syst Biol* 10:12.

Froni C, Galli R, Cipelletti B, Caumo A, Alberti S, Fiocco R, Vescovi A (2007) Resilience to transformation and inherent genetic and functional stability of adult neural stem cells ex vivo. *Cancer Res* 67(8):3725-33.

Freedland SJ, Williams CD, Masko EM (2010) Adiponectin and prostate cancer mortality: to be or not to be skinny? *Clin Chem* 56:1–3.

Freeman HJ: Risk of gastrointestinal malignancies and mechanisms of cancer development with obesity and its treatment (2004) *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18:1167–75.

Freeman VL, Meydani M, Hurr K, Flanigan RC (2004) Inverse association between prostatic polyunsaturated fatty acid and risk of locally advanced prostate carcinoma. *Cancer* 101(12):2744-54.

Fry M, Ferguson AV (2009) Ghrelin modulates electrical activity of area postrema neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(3):485-92.

Gahete MD, Rincon-Fernandez D, Villa-Osaba A, Hormaechea-Agulla D, Ibanez-Costa A, Martinez-Fuentes AJ, et al. (2014) Ghrelin gene products, receptors, and GOAT enzyme: biological and pathophysiological insight, *J. Endocrinol.* 220 (2014) R1eR24.

Gallagher E.J., LeRoith D. Diabetes, cancer, and metformin: connections of metabolism and cell proliferation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1243 (2011) 54e68.

Galusca B, Germain N, Estour B (2016) Maigreur et hormones de régulation de l'appétit. Thinness and appetite regulating hormones. *Médecine des Maladies Métaboliques* 10 (1):22-27.

Gannavarapu, B.S.; Lau, S.K.; Carter, K.; Cannon, N.A.; Gao, A.; Ahn, C.; Meyer, J.J.; Sher, D.J.; Jatoi, A.; Infante, R.; et al. (2018) Prevalence and Survival Impact of Pretreatment Cancer-Associated Weight Loss: A Tool for Guiding Early Palliative Care. *J. Oncol. Pract* 14, e238–50.

Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Schultz N (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signal* 6:11.

Garcia EA, King P, Sidhu K, Ohgusu H, Walley A, Lecoeur C, et al (2009) The role of ghrelin and ghrelin-receptor gene variants and promoter activity in type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 161:307–15.

Garcia JM, Li H, Mann D, Epner D, Hayes TG, Marcelli M, Cunningham GR (2006) Hypogonadism in male patients with cancer. *Cancer* 106:2583–91.

Garg J (2007) The ongoing saga of obestatin: Is it a hormone? *Clin. Endocrinol. Metab* 92: pp.3396-3398.

Gauna C, Delhanty PJD, Hofland LJ, Janssen JAMJL, Broglio F, Ross RJM, Ghigo E, van der Lely AJ (2005) Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 90: 1055–1060.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. (2012) Intratumour heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366(10):883-92.

Giunta EF, Annaratone L, Bollito E, Porpiglia F, Cereda M, Banna GL, Mosca A, Marchio C, Rescigno P (2021) Molecular characterization of prostate cancers in the precision medicine era. *Cancers (Basel)* 13(19):4771.

Gjesing AP, Larsen LH, Torekov SS, Hainerova IA, Kapur R, Johansen A, et al. (2010) Family and population-based studies of variation within the ghrelin receptor locus in relation to measures of obesity. *PLoS One* 5:8.

Globocan (2022) New global cancer data. [www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data](http://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data).

Goldstein JL, Zhao T, Li RL, Sherbet DP, Liang G, Brown MS (2011) Surviving starvation: essential role of the ghrelin-growth hormone axis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* 76: 121–127.

Guan X-M, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJS, Smith RG, Van der Ploeg LHT, Howard AD (1997) Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Mol Brain Res* 48:23-29.

Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling, and Wehrenberg WB (1982) Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromrgaly. *Science* 218: 585-7.

Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE (2008) Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(17) : 6320-5.

Hahn LW, Ritchie MD, Moore JH (2003) Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and geneenvironment interactions. *Bioinformatics* 19:376–82.

Hamdy M, Kassim SK, Khairy E et al (2018) Ghrelin gene polymorphism as a genetic biomarker for prediction of therapy induced clearance in Egyptian chronic HCV patients. *Gene* 649: 74–9.

Han Q, Shan Z, Hu J, Zhang N (2015) Relationship between gene polymorphisms and prostate cancer risk. *Asian Pac J Trop Med* 8(7):569-73.

Hansson C, Annerbrink K, Nilsson S, Bah J, Olsson M, Allgulander C, Andersch S, Sjodin I, Eriksson E, Dickson SL (2013) A possible association between panic disorder and a polymorphism in the preproghrelingene. *Psychiatry Res* 206:22–5.

Hansson C, Shirazi RH, Näslund J, Vogel H, Neuber C, Holm G, Anckarsäter H, Dickson SL, Eriksson E, Skibicka KP (2012) Ghrelin influences novelty seeking behavior in rodents and men. *PLoS One* 7(12):e50409.

Harris RB, Kasser TR, Martin RJ (1986) Dynamics of recovery of body composition after overfeeding, food restriction or starvation of mature female rats. *J Nutr* 116(12):2536-46.

Hassouna R, Grouselle D, Chiappetta G, Lipecka J, Fiquet O, Tomasetto C, Vinh J, Epelbaum J, Tolle V (2017) Combination of Selective Immunoassays and Mass Spectrometry to Characterize Proghrelin-Derived Peptides in Mouse Tissues. *Front. Neurosci* (11).

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 c-fos activity. *Front Endocrinol* 4(25):1-9.

Hassouna R, Zizzari P. and Tolle V (2010) The Ghrelin/Obestatin Balance in the Physiological and Pathological Control of Growth Hormone Secretion, Body Composition and Food Intake. *Journal of Neuroendocrinology* 22: 793–804.

Heidema A, Boer JMA, Nagelkerke N, Mariman ECM, van der A DL, Feskens EJM (2006) The Challenge for Genetic Epidemiologists: How to Analyze Large Numbers of SNPs in Relation to Complex Diseases. *BMC Genet* 21(7):23.

Herbert A, Gerry NP, McQueen MB (2006) A Common Genetic Variant is Associated with Adult and Childhood Obesity. *Journal of Computational Biology* 312:279–384.

Herrera-Martínez, A.D.; Gahete, M.D.; Sánchez-Sánchez, R.; Salas, R.O.; Serrano-Blanch, R.; Salvatierra, Á.; Hofland, L.J.; Luque, R.M.; Gálvez-Moreno, M.A.; Castaño, J.P. (2017) The components of somatostatin and ghrelin systems are altered in neuroendocrine lung carcinoids and associated to clinical-histological features. *Lung Cancer* 109:128–36.

Hébuterne X, Lemarié E, Michallet M, de Montreuil CB, Schneider SM, Goldwasser F (2014) Prevalence of malnutrition and current use of nutrition support in patients with cancer. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 38(2):196-204.

Hicks C, Miele L, Koganti T, Vijayakumar S (2013) Comprehensive assessment and network analysis of the emerging genetic susceptibility landscape of prostate cancer. *Cancer Inform* 12:175-91.

Holliday ND, Holst B, Rodionova EA, Schwartz TW, Cox HM (2007) Importance of constitutive activity and arrestin-independent mechanisms for intracellular trafficking of the ghrelin receptor. *Mol Endocrinol* 21: 3100–3112.

Holst B, Holliday ND, Bach A, Elling CE, Cox HM, Schwartz TW (2004) Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J Biol Chem* 279(51): 53806-17.

Hormaechea-Agulla D (2016) Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) enzyme is overexpressed in prostate cancer, and its levels are associated with patient's metabolic status: Potential value as a non-invasive biomarker. *Cancer Lett* 383 :125–34.

Hormaechea-Agulla D, Gahete MD, Jiménez-Vacas JM, Gómez-Gómez E et al. (2017) The oncogenic role of the In1-ghrelin splicing variant in prostate cancer aggressiveness. *Mol Cancer* 16(1):146.

Hornsby AKE, Buntwal L, Carisi MC, Santos VV, Johnston F, Roberts LD, Sassi M, Mequinion M, Stark R, Reichenbach A, Lockie SH, Siervo M, Howell O, Morgan AH, Wells T, Andrews ZB, Burn DJ, Davies JS (2020) Unacylated-ghrelin impairs hippocampal neurogenesis and memory in mice and is altered in Parkinson's dementia in humans. *Cell Rep Med* 1(7):100120.

Hornsby AKE, Redhead YT, Rees DH, Ratcliff MS, Reichenbach A, Wells T, Francis L, Amstalden K, Andrews ZB, Davies JS (2016) Short-term calorie restriction enhances adult hippocampal neurogenesis and remote fear memory in a Ghrelin-dependent manner. *Psychoneuroendocrinology* 63:198-207.

Hosoda H, Doi K, Nagaya N, Okumura H, Nakagawa E, Enomoto M, Ono F, and Kangawa K (2004) Optimum Collection and Storage Conditions for Ghrelin Measurements: Octanoyl Modification of Ghrelin Is Rapidly Hydrolyzed to Desacyl Ghrelin in Blood Samples. *Clinical Chemistry* 50(6):1077-1080.

Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K (2000) Ghrelin and desacyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 279:909-13.

Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, and 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, Kojima M, Kangawa K (2006) Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *J Pharmacol Sci* 100: 398-410.

Huang Y, Hamana T, Liu J, Wang C, An L, You P, Chang JYF, Xu J, Jin C, Zhang Z, McKeehan WL, Wang F (2015) Type 2 fibroblast growth factor receptor signalling preserves stemness and prevents differentiation of prostate stem cells from the basal compartment. *J Biol Chem* 290(29):17753-61.

Howard AD, Feighner SD, Cully DE, et al (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974-7.

Ittman M (2018) Anatomy and histology of the human and murine prostate. *Cold Spring Harbor Persp Med* 8:a030346.

Jia P, Zhao Z (2017) Impacts of somatic mutations on gene expression: an association perspective. *Brief Bioinform* 18(3):413 –25.

Jiang X, Barmada M, Visweswaran S (2010) Identifying Genetic Interactions in Genome-Wide Data Using Bayesian Networks. *Genet Epidemiol* 34(6): 575–581.

Jiménez-Vacas, J.M., Montero-Hidalgo, A.J., Gómez-Gómez, E., Fuentes-Fayos, A.C., Ruiz-Pino, F., Guler, I., Camargo, A., Anglada, F.J., Carrasco-Valiente, J., Tena-Sempere, M., et al. (2021) In1-Ghrelin Splicing Variant as a Key Element in the Pathophysiological Association Between Obesity and Prostate Cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 106: e4956–68.

Kaaks R, Stattin P (2010) Obesity, endogenous hormone metabolism, and prostate cancer risk: a conundrum of 'highs' and 'lows. *Cancer Prev Res* 3: 259–62.

Kahnau P, Guenther A, Boon MN, Terzenbach JD, Hanitzsch E, Lewejohann L, Brust V (2021) Lifetime observation of cognition and physiological parameters in male mice. *Front Behav Neurosci* 15:709775.

Kaighn ME, Lechner JF, Narayan KS, Jones LW (1978) Prostate carcinoma tissue culture cell lines. *Natl Cancer Inst Monogr* 49 :17-21.

Kardia SLR (2000) Context-Dependent Genetic Effects in Hypertension. *Current Hypertension Reports* 2:32–8.

Kasprzak, A (2022) Role of the Ghrelin System in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 23, 5380.

Kent BA, Beynon AL, Hornsby AKE, Bekinschtein P, Bussey TJ, Davies JS, Saksida LM (2015) The orexigenic hormone acyl-ghrelin increases adulte hippocampal neurogenesis and enhances pattern separation. *Psychoneuroendocrinology* 51:431-9.

Kim SW, Her SJ, Park SJ, Kim D, Park KS, Lee HK, Han BH et al (2005) Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone* 37:359–69.

Kim Y, Kim S, Kim C, Sato T, Kojima M, Park S (2015) Ghrelin is required for dietary restriction-induced enhancement of hippocampal neurogenesis: lessons from ghrelin knockout mice. *Endocr J* 62(3):269-75.

Kohno D, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, Yada T (2003) Ghrelin Directly Interacts With Neuropeptide-Y-Containing Neurons in the Rat Arcuate Nucleus: Ca<sup>2+</sup> Signaling via Protein Kinase A and N-Type Channel-Dependent Mechanisms and Cross-Talk With Leptin and Orexin. *Diabetes* 52 (4): 948–956.

Kohno D, Nakata M, Maekawa F, Fujiwara K, Maejima Y, Kuramochi M, Shimazaki T, Okano H, Onaka T, Yada T (2007) Leptin Suppresses Ghrelin-Induced Activation of Neuropeptide Y Neurons in the Arcuate Nucleus via Phosphatidylinositol 3-Kinase- and Phosphodiesterase 3-Mediated Pathway. *Endocrinology* 148(5): 2251–2263.

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, and Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.

Kojima M, Kangawa K (2005) Ghrelin: Structure and function. *Physiol Rev* 85(2):495-522.

Kokoeva M, Yin H, Flier JS (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310:679-83.

Kotta AS, Kelling AS, Corleto KA, Sun Y, Giles ED (2022) Ghrelin and Cancer: Examining the Roles of the Ghrelin Axis in Tumor Growth and Progression. *Biomolecules* 12:483. Doi: 10.3390/biom12040483.

Kraus D, Reckenbeil J, Wenghoefer M, Stark H, Frentzen M, Allam J-P, Novak N, Frede S, Götz W (2016) Probstmeier, R. Ghrelin promotes oral tumor cell proliferation by modifying GLUT1 expression. *Cell Mol Life Sci* 73 :1287–99.

Labarthe A, and Tolle V (2016) Ghrelin : une hormone gastrique au croisement entre la croissance et la régulation de l'appétit. *Biol Aujourd'hui* 210(4):237-257.

Lambert JC, et al (2009) Genome-Wide Association Study Identifies Variants at CLU and CR1 Associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41:1094–9.

Landa I, Boullosa C, Inglada-Pérez L, Sastre-Perona A, Pastor S, Velázquez A, Mancikova V, Ruiz-Llorente S, Schiavi F, Marcos R, Malats N, Opocher G, Diaz-Uriarte R, Santisteban P, Valencia A, Robledo M (2013) An epistatic Interaction between the PAX8 and STK17B genes in papillary thyroid cancer susceptibility. *PLoS One* 8:e74765.

Landgren S, Jerlhag E, Zetterberg H, Gonzalez-Quintela A, Campos J, Olofsson U, et al. (2008) Association of pro-ghrelin and GHS-R1A gene polymorphisms and haplotypes with heavy alcohol use and body mass. *Alcohol Clin Exp Res* 32:2054–61.

Langren S, Berglund K, Jerlhag E, Fahlke C, Balldin J, Berggren U, Zetterberg H, Blennow K, Jörgen A (2011) Reward-Related Genes and Personality Traits in Alcohol-Dependent Individuals: A Pilot Case Control Study. *Neuropsychobiology* 64:38–46.

Le Morvan V., Formento J.-L., Milano G., Bonnet J., Robert J. (2005) Techniques de recherche des polymorphismes génétiques. *Oncologie* 7: 7-16.

Leung PK, Chow KB, Lau PN, et al (2007) The truncated receptor polypeptide (GHS-R1b) acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor. *Cell signal* 19: 1011-1022.

Li E, Chung H, Kim Y, Kim DH, Ryu JH, Sato T, Kojima M, Park S (2013a) Ghrelin directly stimulates adult hippocampal neurogenesis: implications for learning and memory. *Endocr J* 60(6):781-9.

Li E, Kim Y, Kim S, Park S (2013b) Ghrelin-induced hippocampal neurogenesis and enhancement of cognitive function are mediated independently of GH/IGF-1 axis: lessons from the spontaneous dwarf rats. *Endocr J* 60(9):1065-75.

Li E, Kim Y, Kim S, Sato T, Kojima M, Park S (2014) Ghrelin stimulates proliferation, migration, and differentiation of neural progenitors from the subventricular zone in the adult mice. *Exp Neurol* 252:75-84.

Li Z, Zhang Z, He Z, Tang W, Li T, Zeng Z, He L, Shi YA (2009) A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>). *Cell Res* 19(4):519-23.

Liao N, Xie ZK, Huang J, Xie ZF (2013) Association between the ghrelin Leu72Met polymorphism and type 2 diabetes risk: A meta-analysis. *Gene* 517:179–83.

Liberini CG, Borner T, Boyle CN, Lutz TA (2016) The satiating hormone amylin enhances neurogenesis in the area postrema of adult rats. *Mol Metab* 5(10):834-43.

Lin R, Iacovitti L (2015) Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair. *Brain Res* 1628:327-42.

Lin TC, Hsiao M (2017) Ghrelin, and cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1868, 51–7.

Lin TC, Liu YP, Chan YC, Su CY, Lin YF, Hsu SL, Yang CS, Hsiao M (2015) Ghrelin promotes renal cell carcinoma metastasis via Snail activation and is associated with poor prognosis. *J Pathol* 237:50–61.

Liu B, Garcia EA, Korbonits M (2011) Genetic studies on the ghrelin, growth hormone secretagogue receptor (GHSR) and ghrelin O-acyl transferase (GOAT) genes. *Peptides* 32: 2191–207.

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W., Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4: 357-62.

Louis SA, Mak CKH, Reynolds BA (2013) Methods to culture, differentiate and characterize neural stem cells from the adult and embryonic mouse central nervous system. *Meth Mol Biol* 946:479-506.

Lugilde J, Casado S, Beiroa D, Cunarro J, Garcia-Lavandeira M, Alvarez CV, Nogueiras R, Dieguez C, Tovar S (2022) LEAP-2 counteracts ghrelin-induced food intake in a nutrient, growth-hormone and age independent manner. *Cells* 11:324.

Lukacs RU, Goldstein AS, Lawson DA, Cheng D, Witte ON (2010) Isolation, cultivation, and characterization of adult murine prostate stem cells. *Nat Protoc* 5(4):702-13.

Luque RM (2015) In1-ghrelin, a splice variant of ghrelin gene, is associated with the evolution and aggressiveness of human neuroendocrine tumors: Evidence from clinical, cellular, and molecular parameters. *Oncotarget* 6, 19619–33.

Luquet S, and Cruciani-Guglielmacci C (2009) Le contrôle central de la balance énergétique. *Cahier de nutrition et de diététique* 44 :17-25.

Lv Y, Liang T, Wang G, Li Z (2018) Ghrelin, a gastrointestinal hormone, regulates energy balance and lipid metabolism. *Biosci Rep* 38(5).

Majchrzak K, Szyszko K, Pawłowski K, Motyl T, Król M (2012) A role of ghrelin in cancerogenesis. *Pol J Vet Sci* 15:189–97.

Manavalan R, Priya S (2021) Genetic interactions effects for cancer disease identification using computational models: a review. *Medical & Biological Engineering & Computing* 59:733–58. Doi: 10.1007/s11517-021-02343-9.

Manuguerra M, Matullo G, Veglia F, Autrup H, Dunning AM, Garte S, Gormally E, Malaveille C, Guarrera S, Polidoro S, Saletta F, Peluso M, Airoldi L, Overvad K, Raaschou-Nielsen O, ClavelChapelon F, Linseisen J, Boeing H, Trichopoulos D, Kalandidi A, Palli D, Krogh V, Tumino R, Panico S, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Lund E, Pera G, Martinez C, Amiano P, Barricarte A, Tormo MJ, Quiros JR, Berglund G, Janzon L, Jarvholm B, Day NE, Allen NE, Saracci R, Kaaks R, Ferrari P, Riboli E, Vineis P (2007) Multi-factor dimensionality reduction applied to a large prospective investigation on gene-gene and gene-environment interactions. *Carcinogenesis* 28:414–22. Doi: 10.1093/ carcin/bg1159

Mao Y, Wang J, Yu F, Li Z, Li H, et al. (2016) Ghrelin protects against palmitic acid or lipopolysaccharide-induced hepatocyte apoptosis through inhibition of MAPKs/iNOS and restoration of Akt/eNOS pathways. *Biomed Pharmacother* 84: 305-13.

Marchini J, Donnelly P, Cardon LR (2005) Genome-Wide Strategies for Detecting Multiple Loci that Influence Complex Diseases. *Nature Genetics* 37:413–7.

Marcus MW, Raji OY, Duffy SW, Young RP, Hopkins RJ, Field JK (2016) Incorporating epistasis interaction of genetic susceptibility single nucleotide polymorphisms in a lung cancer risk prediction model. *Int J Oncol* 49: 361–370. Doi: 10.3892/ijo.2016.3499.

Marzolini C, Paus E, Buclin T and Kim RB (2004) Polymorphisms in human MDR1 (Pglycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 75:13- 33.

May Salem Al-Nbaheen (2023) Relationship between single nucleotide polymorphism studies in ghrelin gene with obesity subjects. *Journal of King Saud University – Science* 35:102393.

Mequinion M, Langlet F, Zgheib S, Dickson S, Dehouck B, Chauveau C, and Viltart O (2013) Ghrelin: central and peripheral implications in anorexia nervosa. *Frontiers in endocrinology* 4:15.

Millstein J, Siegmund KD, Conti DV, Gauderman WJ (2005) Identifying Susceptibility Genes by Using Joint Tests of Association and Linkage and Accounting for Epistasis. *BMC Genetics* 6(Suppl 1): S147.

Milne RI, Fagerholm R, Nevanlinna H, Benítez J (2008) The importance of replication in gene-gene interaction studies: multifactor dimensionality reduction applied to a two-stage breast cancer case-control study. *Carcinogenesis* 29:1215–18. Doi: 10.1093/carcin/bgn120

Mitome M, Low HP, Rodriguez KML, Kitamoto M, Kitamura T, Schwartz WJ (2008) Neuronal differentiation of EGF-propagated neurosphere cells after engraftment to the nucleus of the solitary tract. *Neurosci Lett* 444:250-3.

M'Kadmi C, Leyris JP, Onfroy L, Galés C, Didier Gagne A, Damian MSM, Denoyelle S, Verdié P, Fehrentz JA, Martinez J, Banères JL, and Jacky M (2015) Agonism, Antagonism, and Inverse Agonism Bias at the Ghrelin Receptor Signaling. *J Biol Chem* 290(45):27021–27039.

Moniuszko A, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Bossowska A, Goscik J, Luczynski W, Glowinska-Olszewska B, Kretowski A, Bossowski A (2015) The association between

rs4684677 T/A polymorphism in preproghrelin gene and predisposition to autoimmune thyroid diseases in children. *Autoimmunity* 48 :418–22.

Montpetit A, Chagnon F (2006) La Carte d'Haplotype du génome humain Une révolution en génétique des maladies à hérédité complexe. *Medecine/Sciences* 22: 1061-7.

Moon M, Cha MY, Mook-Jung I (2014) Impaired hippocampal neurogenesis and its enhancement with ghrelin in 5XFAD mice. *J Alzheimers Dis* 41(1):233-41.

Moon M, Kim S, Hwang L, Park S (2009) Ghrelin regulated hippocampal neurogenesis in adult mice. *Endocr J* 56(3):525-31.

Moore JH, Gilbert JC, Tsai CT, Chiang FT, Holden TBN, White BC (2006) A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *J Theoretical Biol* 241:252-61.

Moore JH, Williams SM (2002) New Strategies for Identifying Gene-gene Interactions in Hypertension. *Annals of Medicine* 34:88–95.

Mora M, Adam V, Palomera E, Blesa S, Díaz G, Buquet X, et al. (2015) Ghrelin Gene Variants Influence on Metabolic Syndrome Components in Aged Spanish Population. *PLoS ONE* 10(9): e0136931.

Mora M, Mansego ML, Serra-Prat M, Palomera E, Boquet X, Chaves JF, Puig-Domingo M, Mataro Ageing Study Group (2014) Glucose impairment and ghrelin gene variants are associated to cognitive dysfunction. *Aging Clin Exp Res* 26:161–9.

Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289-295.

Morton GJ, Meek TH, Schwartz MW (2014) Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 15(6):367-78.

Mostowska A, Sajdak S, Pawlik P, Lianeri M, Jagodzinski PP (2013) DNMT1, DNMT3A and DNMT3B gene variants in relation to ovarian cancer risk in the Polish population. *Mol Biol Rep* 40:4893–9.

Moyse E, Bauer S, Charrier C, Coronas V, Krantic S, Jean A (2006) Neurogenesis and neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat brain: new vistas about autonomic regulations. *Auton Neurosci* 126-7(1-2):30-8.

Moyse E, Segura S, Liard O, Mahaut S, Mechawar N (2008) Control of proliferation and lineage commitment in adult neural stem cells by tissular microenvironment in healthy and post-lesional conditions. *Curr Stem Cell Res Ther* 3(3):163-84.

Muller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, et al. (2015) Ghrelin, *Mol Metab* 4:437e460.

Muscaritoli, M.; Arends, J.; Bachmann, P.; Baracos, V.; Barthelemy, N.; Bertz, H.; Bozzetti, F.; Hütterer, E.; Isenring, E.; Kaasa, S.; et al. (2021) ESPEN practical guideline: Clinical Nutrition in cancer. *Clin Nutr* 40, 2898–913.

Nagel RI (2005) Epistasis and the Genetics of Human Diseases. *C R Biologie* 328:606–15.

Nass R, Pezzoli SS, Oliveri MC, Patrie JT, Harrell FE Jr, Clasey JL, Heymsfield SB, Bach MA, Vance ML, Thorner MO (2008) Effects of an oral ghrelin mimetic on body composition and clinical outcomes in healthy older adults: a randomized trial. *Ann Intern Med* 149(9):601-11.

Nguyen TV, Yueh B (2002) Weight loss predicts mortality after recurrent oral cavity and oropharyngeal carcinomas. *Cancer* 95, 553–62.

Niall HD (1971) Revised primary structure for human growth hormone. *Nat New Biol* 230:90-1.

Olavi Ukkola (2011) Genetic variants of ghrelin in metabolic disorders. *Peptides* 32:2319–22.

Osterstock G, Escobar P, Mitutsova V, Gouty-Colomer LA, Fontanaud P et al (2010) Ghrelin stimulation of growth hormone-releasing hormone neurons is direct in the arcuate nucleus. PLoS ONE, Public Library of Science 5(2):9159.

Pabalan NA, Seim I, Jarjanazi H, Chopin LK (2014) Associations between ghrelin and ghrelin receptor polymorphisms and cancer in Caucasian populations: a meta-analysis. BMC Genet 15:118.

Patchett AA, Nargund RP, Tata JR, Chen MH, Barakat KJ, and Johnston DB (1995) Design and biological activities of L-163,191 (MK-0677): a potent, orally active growth hormone secretagogue. Proc Natl Acad Sci U S A (92):7001-5.

Pecchi E, Dallaporta M, Charrier C, Pio J, Jean A, Moyse E, Troadec JD (2007) Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing cells exhibiting a radial morphology are present in the nucleus of the solitary tract of adult rat. J Comp Neurol 501(3):353-68.

Peroni CN, Hayashida CY, Nascimento N, Longuini VC, Toledo RA, Bartolini P, Bowers CY, Toledo SP (2012) Growth hormone response to growth hormone-releasing peptide-2 in growth hormone-deficient little mice. Clinics (Sao Paulo) 67(3):265-72.

Pignon JC, Grisanzio C, Geng Y, Song J, Shivdasani RA, Signoretti S (2013) p63-expressing cells are the stem cells of developing prostate, bladder, and colorectal epithelia. Proc Natl Acad Sci USA 110:8105-10.

Piper NBC, Whitfield EA, Stewart GD, Xu X, Furness SBG (2022) Targeting appetite and satiety in diabetes and obesity, via G protein-coupled receptors. Biochem Pharmacol 202:115115.

Papotti M, Ghe C, Cassoni P, et al (2000) Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. J Clin Endocrinol Metab 85:3803-7.

Poisson J., Martinez-Tapia C., Heitz D., Geiss R., Albrand G., Falandry C., Gisselbrecht M., Couderc A.L., Boulahssass R., Liuu E., Boudou-Rouquette P., Wakilian A.C., Gaxatte C., Pamoukdjian F., de Decker L., Antoine V., Cattenoz C., Solem-Laviec H., Guillem O., Medjenah H., Natella P.A., Canoui-Poitrine F., Laurent M. and Paillaud E (2021) Prevalence and prognostic impact of cachexia among older patients with cancer: a nationwide cross-sectional survey (NutriAgeCancer). *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 12: 1477–88.

Popovici D., Stanisav C., Pricop M., Dragomir R., Saftescu S., Ciurescu D (2023) Associations between Body Mass Index and Prostate Cancer: The Impact on Progression-Free Survival. *Medicina* 59:289. Doi:10.3390/medicina59020289.

Porto-Neto LR, Kijas JW, Reverter A (2014) The extent of linkage disequilibrium in beef cattle breeds using high-density SNP genotypes. *Genetics Selection Evolution* 46:22. Doi: 10.1186/1297-9686-46-22.

Pungsrinont T, Kallenbach J, Baniahmad A (2021) Role of PI3-AKT-mTOR pathway as a pro-survival signaling and resistance-mediating mechanism to therapy of prostate cancer. *Int J Mol Sci* 22(20):11088.

Qin J, Cai Y, Xu Z, Ming Q, Ji SY, Wu C, Zhang H, Mao C, Shen DD, Hirata K, Ma W, Zhang Y, Shao Z (2022) Molecular mechanism of agonism and inverse agonism in ghrelin receptor. *Nat Commun* 13(1) : 300.

Rachidi F, Moyse E (2011) La neurobiologie de la prise alimentaire (I). La neurobiologie de la nutrition, une grande fonction neuroendocrine. *Biomatec ECHO* 4(7) :26-38.

Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, et al. (2001) Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 411: 199–204.

Rettori V, Milenkovic L, Aguila MC, McCann SM (1990) Physiologically significant effect of neuropeptide Y to suppress growth hormone release by stimulating somatostatin discharge. *Endocrinology* 2296-2301.

Reynolds BA, Rietze RL (2005) Neural stem cells and neurospheres – reevaluating the relationship. *Nat Methods* 2(5):333-6.

Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-10.

Ringuet MT, Furness JB, Furness SGB (2022) G protein-coupled receptor interactions and modification of signalling involving the ghrelin receptor, GHSR1a. *J Neuroendocrinol* 34(9): e13077.

Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey R, Dupont WD, Parl FF, Moore JH (2001) Multifactor-Dimensionality Reduction Reveals High-Order Interactions among Estrogen Metabolism Genes in Sporadic Breast Cancer. *Am J Human Genet* 69:138-147.

Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Jacobs EJ, Chao A, Thun MJ (2001) Body mass index, height, and prostate cancer mortality in two large cohorts of adult men in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 345–53.

Rong Huang, Jing Han, Sai Tian, Jie Sun, Yanjue Shen, Shaohua Wang (2017) Association of plasma ghrelin levels and ghrelin rs4684677 polymorphism with mild cognitive impairment in type 2 diabetic patients. *Oncotarget* 8(9):15126-15135.

Salome N, Haage D, Perrissoud D, Moulin A, Demange L, Egecioglu E, Fehrentz JA, Martinez J, Dickson SL (2009) Anorexigenic and electrophysiological actions of novel ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonists in rats. *Eur J Pharmacol* 612(1–3):167–173.

Sanche S (2008) Utilisation de triades cas-parents dans la régression logique : exploration d'interaction génétique. Thèse de Doctorat, Université de Montréal, p 112.

Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, Ohgusu H, Kangawa K, Kojima M (2012) Structure, regulation and function of ghrelin. *J Biochem* 151(2):119-28.

Schellekens HBC, Finger TG, Dinan, and Cryan JF (2012) Ghrelin signalling and obesity: at the interface of stress, mood, and food reward. *Pharmacology and Therapeutics* 135(1): 316-326.

Schwartz MW, Woods SC, Porte JrD, Seeley RJ and Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404(6778): 661-671.

Seim I, Herington AC, Chopin LK (2009) New insights into the molecular complexity of the ghrelin gene locus. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 297–304.

Sever S, White DL, Garcia JM (2016) Is there an effect of ghrelin/ghrelin analogs on cancer? A systematic review. *Endocr Relat Cancer* 23:R393–409. doi: 10.1530/ERC-16-0130

Shi YY, He L (2005) SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res* 15(2):97-8.

Shang, L.; Hattori, M.; Fleming, G.; Jaskowiak, N.; Hedeker, D.; Olopade, O.I.; Huo, D. (2021) Impact of post-diagnosis weight change on survival outcomes in Black and White breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 23:18.

Shibata N, Ohnuma T, Kuerban B, Komatsu M, Arai H (2011) Genetic association between ghrelin polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population. *Dement Geriatr Cogn Disord* 32:178–8.

Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH (2000) Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 20:8727-35.

Skibola DR, Smith MT, Bracci PM, Hubbard AE, Agana L, Chi S, Holly EA (2005) Polymorphisms in ghrelin and neuropeptide Y genes are associated with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(5):1251–6.

Spiridon IA, Apostol Ciobanu DG, Giușcă SE, Cărintu DI (2021) Ghrelin and its role in gastrointestinal tract tumors (Review). *Mol Med Rev* 24: 663.

Staal-van den Brekel AJ, Dentener MA, Schols AM, Buurman WA, Wouters EF (1995) Increased resting energy expenditure and weight loss are related to a systemic inflammatory response in lung cancer patients. *J Clin Oncol* 13:2600–5.

Steinle NI, Pollin TI, O’Connell JR, Mitchell BD, Shuldiner AR (2005) Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the Old Order Amish. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6672–7.

Stievenard A, Méquinion M, Andrews ZB, Destée A, Chartier-Harlin MC, Viltart O, Vanbesien-Mailliot CC (2017) Is there a role for ghrelin in central dopaminergic systems? Focus on nigrostriatal and mesocorticolimbic pathways. *Neurosci Biobehav Rev* 73: 255-75.

Tang YF, Qi, et al (2013) Ghrelin protects heart against ERS-induced injury and apoptosis by activating AMP-activated protein kinase. *Peptides* 48:156-165.

Tannenbaum GS, Epelbaum J, And Bowers CY (2003) Interrelationship between the Novel Peptide Ghrelin and Somatostatin/Growth Hormone-Releasing Hormone in Regulation of Pulsatile Growth Hormone Secretion. *Endocrinology* 144(3):967– 74.

Templeton AR (2000) Epistasis and Complex Traits. In: Wade M, Brodie B III, Wolf J, editors. *Epistasis and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, New York pp. 41–57.

Tisdale MJ (2009) Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev* 89:381–410.

Tisdale MJ (2000) Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. *Nutrition* 16:1013–4.

Toda T, Parylak SL, Linker SB, Gage FH (2019) The role of hippocampus neurogenesis in brain health and disease. *Mol Psychiatry* 24(1):67-87.

Tolle V, Bassant MH, and Zizzari P (2002) Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 143(4):1353-61.

Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, et al (2001) *In vivo* and *in vitro* effects ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 73: 54-61.

Tomasetto C, Karam SM, Ribieras S, Masson R, Lefèbvre O, Staub A, Alexander G, Chenard MP, Rio MC (2000) Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: The motilin-related peptide. *Gastroenterology* 119(2): 287-288.

Tounian A, Laferrere B, and Guy-Grand B (2005) La ghréline: seule hormone orexigène connue. *Cah. Nutr. Diét* 40(5):270-80.

Travis R.C., P.N. Appleby, R.M. Martin, J.M. Holly, D. Albanes, A. Black, et al (2016) A meta-analysis of individual participant data reveals an association between circulating levels of IGF-I and prostate cancer risk, *Cancer Res.* 76 (8):2288-300.

Trevaskis JL, Turek VF, Wittmer C, Griffin PS, Wilson JK, Reynolds JM, Zhao Y, Mack CM, Parkes DG, Roth JD (2010) Enhanced amylin-mediated body weight loss in estradiol-deficient diet-induced obese rats. *Endocrinology* 151(12):5657-68.

Tschop MH, Smiley DL, Heiman ML (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-13.

Tsubouchi H, Onomura H, Saito Y, Yanagi S, Miura A, Matsuo A, Matsumoto N, Nakazato M (2017) Ghrelin does not influence cancer progression in a lung adenocarcinoma cell line. *Endocr J* 64 (Suppl.): S41-6.

Tullin S, Hansen BS, Ankersen M, et al. (2000) Adenosine is an agonist of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 141:3397-402.

Ukkola O, Paakko T, and Kesaniemi YA (2011) Ghrelin and its promoter variant associated with cardiac hypertrophy. *Journal of human hypertension* 26(7):452-7.

Uysal P, Afsar CU, Sozer V, Inanc B, Agaoglu F, Gural Z, Fazlioglu NY, Cuhadaroglu C, Uzun H (2020) Evaluation of the relationship between serum ghrelin levels and cancer cachexia in patients with locally advanced nonsmall-cell lung cancer treated with chemoradiotherapy. *J. Cancer Res Ther* 16, 855-9.

Van der Lely AJ, Lamberts SW, Jauch KW, Swierstra BA, Hertlein H, de Vries DD, et al (2000) Use of human GH in elderly patients with accidental hip fracture. *Eur J Endocrinol* 143(5):585-92.

Van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, and Ghigo E (2004) Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25: 426-57.

Velez DR, White BC, Motsinger AA, Bush WS, Ritchie MD, Williams SM, Moore JH (2007) A Balanced Accuracy Function for Epistasis Modeling in Imbalanced Dataset using Multifactor Dimensionality Reduction. *Genetic Epidemiology* 31:306–315.

Villarreal D, Pradhan G, Zhou Y, Xue B, Sun Y (2022) Diverse and Complementary Effects of Ghrelin and Obestatin. *Biomolecules* 12 :517.

Volante M, Allia E, Fulcheri E, Cassoni P, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M (2003) Ghreline dans les tumeurs thyroïdiennes et folliculaires fœtales et les lignées cellulaires : expression et effets sur la croissance tumorale. *Un m. J. Pathol* 162: p 645-654.

Wang W, Andersson M, Iresjö BM, Lönnroth C, Lundholm K (2006) Effects of ghrelin on anorexia in tumor-bearing mice with eicosanoid-related cachexia. *Int J Oncol* 28:1393–400.

Wang W, Chen ZX, Guo DY, Tao YX (2018) Regulation of prostate cancer by hormone-responsive G protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 191:135-47.

Wang X, Wang Y, Gratzke C, Sterr C, Yu Q, Li B, Strittmatter A, Herlemann A, Tamalunas A, Rutz B, Ciotkowska A, Waidelich R, Liu C, Stief CG, Hennenberg M (2019) Ghrelin aggravates prostate enlargement in rats with testosterone-induced benign prostatic hyperplasia, stromal cell proliferation, and smooth muscle contraction in human prostate tissues. *Oxid Med Cell Longev* 22:2019-4748312.

Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA (1996) Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16(23):7599-609.

Williams JT, Christie MJ, Manzoni O (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol. Rev* 81:299-343.

Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillon WS, Ghatei MA, Bloom SR (2001) Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocr Metab* 86:5992.

Wren AM, Small CJ, Fribbens CV, Neary NM, Ward HL, Seal LJ, Ghatei MA, and Bloom SR (2002) The hypothalamic mechanism of the hypophysiotropic action of ghrelin. *Neuroendocrinology* 76:316–324.

Xin L, Lukacs RU, Lawson DA, Cheng D, Witte ON (2007) Self-renewal and multilineage differentiation in vitro from murine prostate stem cells. *Stem Cells* 25:2760-9.

Yanagi S, Sato T, Kangawa K, Nakazato M (2018) The Homeostatic Force of Ghrelin. *Cell Metab* 27(4): 786-804.

Yeh AH, Jeffery PL, Duncan RP, Herington AC, Chopin LK (2005) Ghrelin and a novel preproghrelin isoform are highly expressed in prostate cancer and ghrelin activates mitogen-activated protein kinase in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11:8295–303.

Zeng X, Chen P, Zhao L, Chen S (2020) Acylated and unacylated ghrelin relieve cancer cachexia in mice through multiple mechanisms. *Chin J Physiol* 63:195–203.

Zhang JV, Ren PG, and Avsian-Kretchmer O (2005) Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310: 996-9.

Zhang Q, Huang W.D., Lv X.Y., Yang Y.M. (2011) Ghrelin protects H9c2 cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis through NF-kappaB and mitochondria-mediated signaling. *Eur J Pharmacol* 654: 142-9.

Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK (2006) Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol* 494(3) : 528-48.

Zizzari P (2007) Implication de ghrélines/ obestatine, deux peptides issus du même précurseur, dans le contrôle de la secretion d'hormone de croissance et du comportement alimentaire. Thèse de doctorat. Université paris XI.

Zizzari P, Epelbaum J and Tolle V (2008) Ghréline et reproductionmt. *Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 10 (2) : 85-93.

Zizzari P, Hassouna R, Grouselle D, Epelbaum J, Tolle V (2011) Physiological roles of preproghrelin-derived peptides in GH secretion and feeding. *Peptides* 32(11) : 2274-82.

# **Annexe**

**Liste des différents SNPs du gène de la préproghreline et du *GHS-R* déjà étudiés.**

SNPs	Localisation	SNPs Type	Aspects clinique	Références
<p align="center"><b>C&gt;G, T</b> <b>rs27647</b> <b>MAF 0.325</b></p>	<p align="center">Promoteur Intron Près de la région 5' 10290784</p>		<p>824 sujets (413 hommes / 411 femmes, 77,31 ± 5,04 ans) le SNPs associé à un glucose &gt; 100 mg , association avec une augmentation de cholestérole total et LD</p> <p>680 Cas et 593 control dans une population caucasienne le SNP a été trouvé associé au taux d'insuline et à l'obésité,</p>	<p>Mora M et al, Ghrelin Gene Variants Influence on Metabolic Syndrome Components in Aged Spanish Population. PLoS One. 2015</p> <p>Campa D, et al, Polymorphisms of genes coding for ghrelin and its receptor in relation to colorectal cancer risk: a two-step gene-wide case-control study. BMC Gastroenterology 2010, 10:112.</p>
<p align="center"><b>G&gt;T</b> <b>rs696217</b> <b>MAF 0.09045</b></p>	<p align="center">10289773 Exon 3</p>	<p align="center">Mutation Missens (Leu72Met) 1</p>	<p>142 patients 209 témoin Le genotype GG et GT et l'alléle G assoié avec la susceptibilité du syndrome du colon irritable, l'alléle T à un effet protecteur</p> <p>-8 430 cas et 14 008 témoins d'une population caucasienne le SNP peuvent protéger les porteurs contre le cancer du sein</p> <p>824 sujets (413 hommes / 411 femmes, âgés de 77,31 ± 5,04 ans) participant à l'étude sur le vieillissement Mataró (n =</p>	<p>Kalli T et al, Ghrelin Gene Polymorphisms in Irritable Bowel Syndrome. Digestion. 2020 ; 15:1-6.</p> <p>Pabalan NA et al, Associations between ghrelin and ghrelin receptor polymorphisms and cancer in Caucasian populations: a meta-analysis. BMC Genet. 2014; 7;15:118.</p> <p>Mora M et al, Mataró Aging Study Group. Ghrelin Gene Variants</p>

			310) et à l'étude Hortega (n = 514) ont été analysés le SNP est associés à certains composants de la SEP, en particulier à l'IMC et au profil lipidique chez les sujets espagnols âgés.	Influence on Metabolic Syndrome Components in Aged Spanish Population. PLoS One. 2015; 16;10(9):e0136931.
<b>T&gt;A</b> <b>rs4684677</b> <b>MAF 0.057</b>	Obestatin Exon 3 10286769	Missense Gln90Leu	<p>145 patients avec GD, 87 avec HT et 161 volontaires sains Contribue au développement des maladies thyroïdiennes autoimmunes et l'allèle T et le facteur de risque</p> <p>-215 patients souffrant de trouble panique et chez 451 témoins associé à un risque accru de trouble panique</p> <p>- 8 430 cas et 14 008 témoins d'une population caucasienne et le SNP augmente le risque chez le porteur de cancer de sein.</p> <p>- 856 échantillons Amish SNPs peuvent entraîner un risque de syndrome métabolique</p>	<p>-Moniuszko A et al, The association between rs4684677 T/A polymorphism in preproghrelin gene and predisposition to autoimmune thyroid diseases in children. Autoimmunity. 2015;48(6):418-22</p> <p>-Hansson C et al, A possible association between panic disorder and a polymorphism in the preproghrelingene. Psychiatry Res. 2013 Mar 30;206(1):22-5.</p> <p>-Pabalan NA et al, Associations between ghrelin and ghrelin receptor polymorphisms and cancer in Caucasian populations: a meta-analysis. BMC Genet. 2014 Nov 7;15:118</p> <p>-Steinle NI et al, Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the Old Order Amish. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Dec;90(12):6672-7.</p>

			- Un total de 218 patients atteints de DT2, dont 112 patients satisfaisant aux critères diagnostiques du MCI et 106 présentant une cognition saine, la diminution de ghreline est associé au MCI et en particulier avec un dysfonctionnement de la mémoire épisodique dans les populations de DT2	Rong Huang et al. Association of plasma ghrelin levels and ghrelin rs4684677 polymorphism with mild cognitive impairment in type 2 diabetic patients. <i>Oncotarget</i> , 2017, 8(9):15126-15135.
<b>C&gt;T</b> <b>rs34911341</b> <b>MAF 0.007</b>	Ghrelin-28 Exon 2 10289835	Mutation Missense (Arg51Gln)	-257 patients atteints de IRT, la ghreline pourrait être un marqueur majeur contribuant à la sensibilité au (syndrome de malnutrition inflammatoire) MIS chez les patients atteints d'IRT. (maladies rénales en phase terminale)  -2504 individus étudiés et le SNP est associé aux troubles métaboliques tels que le diabète, l'hypertension et l'obésité.	Sharma R et al. Association of genetic variants of ghrelin, leptin and UCP2 with malnutrition inflammation syndrome and survival in end-stage renal disease patients. <i>Genes Nutr</i> . 2013 Nov;8(6):611-21.  Laysa T M et al, Molecular Studies on Preproghrelin Gene: Signal Peptide, Ghrelin Coding Region and Variants – A Brief Report Focusing on rs34911341 Polymorphism 2017 December;5(2):50-53
<b>T&gt;G</b> <b>rs26802</b> <b>MAF 0.318</b>	Promoteur Intron 10290681	Intron	824 subjects (413 men/411 women) impliqués dans le syndrome métabolique en particulier à l'IMC et au profil lipidique chez les sujets espagnols âgés  103 patients atteints de PR et 103 témoins sains le SNP est associé à l'apparition précoce de la PR (polyarthrite rhumatoïde)	Mora M et al, Mataró Aging Study Group. Ghrelin Gene Variants Influence on Metabolic Syndrome Components in Aged Spanish Population. <i>PLoS One</i> . 2015 Sep 16;10(9):e0136931.  Metin Ozgenca, Suleyman Serdar Kocaa, Ebru Onalan Etem. Ghrelin gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. <i>Joint</i>

				Bone Spine 78 (2011) 368–373
<b>T&gt;C</b> <b>rs2075356</b> <b>MAF 0.095</b>	Intron 2 10287125		-8 430 cas et 14 008 témoins d'une population caucasienne le SNP peuvent protéger les porteurs contre le cancer du sein	Pabalan NA et al, Associations between ghrelin and ghrelin receptor polymorphisms and cancer in Caucasian populations: a meta-analysis. BMC Genet. 2014 Nov 7;15:118.
<b>A&gt;C</b> <b>rs35683</b> <b>MAF 0.299</b>	Intron 3 10286566		355 variantes génétiques communes de 30 gènes candidats dans sept voies moléculaires liées à l'obésité en 1982 des Américains européens SNPs associé à l'IMC	Li P, Tiwari HK, Lin WY, Allison DB, Chung WK, Leibel RL, Yi N, Liu N. Genetic association analysis of 30 genes related to obesity in a European American population. Int J Obes (Lond). 2014 May;38(5):724-9.
<b>A&gt;C, G</b> <b>rs35684</b> <b>MAF 0.27</b>	Exon 1 Près de la région 3' 10285002	Substitution de transition dans l'exon 1	1464 sujets du Canada, Aucune Association entre des profils de lipides corporels et de lipides sériques avec le SNP	Martin GR, Loredo JC, Sun G. Lack of association of ghrelin precursor gene variants and percentage body fat or serum lipid profiles. Obesity (Silver Spring). 2008 Apr;16(4):908-12.
<b>C&gt;G, T</b> <b>rs35680</b> <b>MAF 0.287</b>	Intron 2 10305564	Intron	113 femmes de race blanche hospitalisées, toutes les critères de dépendance à l'alcool 107 ont été envoyés à l'unité de traitement ces SNPs sont impliqués dans l'héritabilité paternelle et peuvent affecter d'autres facteurs liés à la récompense et à l'énergie tels que le tabagisme et l'IMC.	Landgren S, Jerlhag E, Hallman J, Orelund L, Lissner L, Strandhagen E, Thelle DS, Zetterberg H, Blennow K, Engel JA. Genetic variation of the ghrelin signaling system in females with severe alcohol dependence. Alcohol Clin Exp Res. 2010 Sep 1;34(9):1519-24.
<b>G&gt;A, C</b> <b>rs1629816</b> <b>MAF 0.421</b>	Variante en amont de 2 Ko 10294607		65 patients atteints d'un cancer de la tête et du cou ayant subi une irradiation une association entre le génotype AA du gène	Brzozowska A, Homa-Mlak I, Mlak R, Gołębiowski P, Mazurek M, Ciesielka M, Małecka-Massalska T.

			GHRL et le risque de mucite buccale plus sévère attribuée à la RT chez les patients atteints d'un cancer de la tête et du cou.	Polymorphism of regulatory region of GHRL gene (-2531C>T) as a promising predictive factor for radiotherapy-induced oral mucositis in patients with head neck cancer. Head Neck. 2018 Aug;40(8):1799-1811.
<b>C&gt;A, G, T</b> <b>rs3755777</b> <b>MAF 0.218</b>	Promoteur Intron 10291680		117 femmes japonaises obèses, le gène est associé à un faible appétit, bien qu'ils soient prédisposés à l'obésité.	Takezawa J, Yamada K, Miyachi M, Morita A, Aiba N, Sasaki S, Watanabe S; Saku Control Obesity Program (SCOP) Study Group. Preproghrelin gene polymorphisms in obese Japanese women. Minor homozygotes are light eaters, do not prefer protein or fat, and apparently have a poor appetite. Appetite. 2013 Apr;63:105-11.
<b>C&gt;A, G</b> <b>rs26311</b> <b>MAF 0.119</b>	Promoteur 10291242	Près de la région 3' non traduite	176 patients avec CHB, 106 patients avec LC liée au VHB, 151 patients avec CHB lié au VHB et 167 témoins sains d'une population chinoise associé à un risque accru de CL liée au VHB,chez les homme surtout une association inverse des taux sériques de GHRL avec LC. Associé avec le risque de l'obésité, le syndrome métabolique, le diabète de type 2, le cancer du sein et le cancer colorectal.	Zhang X, Zhai L, Rong C, Qin X, Li S. Association of Ghrelin Gene Polymorphisms and Serum Ghrelin Levels with the Risk of Hepatitis B Virus-Related Liver Diseases in a Chinese Population. PLoS One. 2015 Nov 23;10(11):e0143069.
			100 participants égyptiens 90 patients VHC et 10 sujets non sains, il n y a pas d'association entre le	Hamdy M, Kassim SK, Khairy E, Maher M, Mansour KA, Albreedy AM. Ghrelin gene polymorphism as a

<p><b>G&gt;A</b> <b>rs26312</b> <b>MAF 0.125</b></p>	<p>Promoteur 10291174</p>		<p>taux de ghréline chez les patients et les témoins</p>	<p>genetic biomarker for prediction of therapy induced clearance in Egyptian chronic HCV patients. <i>Gene</i>. 2018 Apr 5;649:74-79.</p>
<p><b>rs2948694 A/G</b></p>	<p>Intron 1</p>	<p>Intron</p>	<p>4161 sujets d'un total de 1756 familles (581 paires de jumeaux monozygotes et 380 dizygotes, 910 frères et sœurs et 1329 singletons) le polymorphisme était nominalement associé à des scores AUDIT plus élevés (P=0,0204, modèle récessif) et au tabagisme selon</p> <p>Des rats Sprague-Dawley mâles adultes (n=195 ; poids corporel de 150 à 175 g au début des tests) ont été utilisés et nous avons constatés une association de manière significative à la recherche de la nouveauté du trait de personnalité, telle qu'évaluée à l'aide de l'inventaire du tempérament et du caractère (TCI), chez les sujets humains</p>	<p>Petra Suchankova, <sup>1</sup>Staffan Nilsson, <sup>2</sup>Bettina von der Pahlen, <sup>3</sup>Pekka Santtila, <sup>3</sup>Kenneth Sandnabba, <sup>3</sup>Ada Johansson, <sup>1</sup>Patrick Jern, <sup>3</sup>Jörgen A. Engel, <sup>1</sup> and Elisabet Jerlhag. Genetic variation of the growth hormone secretagogue receptor gene is associated with alcohol use disorders identification test scores and smoking 2015. <i>Addict Biol</i> ; 21(2): 481–488</p> <p>Hansson C et al., 2012 Shirazi RH, Näslund J, et al. Ghrelin influences novelty seeking behavior in rodents and men. <i>PLoS One</i>. 2012;7(12)</p> <p>Xiaowei Sherry Yan, Jill Barnholtz-Sloan, Xin Chu, Ling Li, Ryan Colonie, Jessica Webster, Diane Smelser, Nikitaban Patel, Jeffery</p>

			<p>Un total de 180 cas et 732 témoins appariés selon l'âge ont été identifiés à partir de la base de données prospective de la biobanque MyCode, ont associés une augmentation de deux fois du risque de cancer du sein pour les porteurs homozygotes de ce SNP</p>	<p><a href="#">Prichard</a>, and <a href="#">Azadeh Stark</a>. Adiposity, inflammation, genetic variants and risk of postmenopausal breast cancer findings from a prospective-specimen-collection, retrospective-blinded-evaluation (PRoBE) design approach ; <a href="#">Springerplus</a>. 2013; 2: 638.</p>
<p><b>rs572169 A/G</b> Arg 159 Arg MAF 0.342/0.274</p>	<p>Exon 1 173648421</p>	<p>Mutation synonyme</p>	<p>Des données individuelles sur 8 430 cas et 14 008 témoins issus de six études cas-témoins portant sur une population entièrement caucasienne ont été évaluées, ils ont associés que ce polymorphisme peut augmenter le risque chez les porteur du cancer du sein</p> <p>Dans une étude cas-témoin portant sur 1089 Danois les plus âgés (92 à 93 ans) et 736 Danois d'âge moyen la présente étude d'association basée sur les gènes candidats, la plus importante à ce jour appliquant une approche par voie, indique de nouveaux loci potentiels de longévité, mais souligne également les difficultés de répliquer les résultats d'association dans des populations d'études indépendantes et donc les difficultés</p>	<p><a href="#">Noel A Pabalan</a>, <a href="#">Inge Seim</a>, <a href="#">Hamdi Jarjanazi</a>, and <a href="#">Lisa K Chopin</a>, Associations between ghrelin and ghrelin receptor polymorphisms and cancer in Caucasian populations: a meta-analysis. <a href="#">BMC Genet</a>. 2014; 15: 118.</p> <p><a href="#">Mette Soerensen</a>,<sup>1,2</sup> <a href="#">Serena Dato</a>,<sup>1,3</sup> <a href="#">Qihua Tan</a>,<sup>1,2</sup> <a href="#">Mikael Thinggaard</a>,<sup>1</sup> <a href="#">Rabea Kleindorp</a>,<sup>4</sup> <a href="#">Marian Beekman</a>,<sup>5,6</sup> <a href="#">Rune Jacobsen</a>,<sup>1</sup> <a href="#">H. Eka D. Suchiman</a>,<sup>5,6</sup> <a href="#">Anton J.M. de Craen</a>,<sup>7</sup> <a href="#">Rudi G.J. Westendorp</a>,<sup>7</sup> <a href="#">Stefan Schreiber</a>,<sup>4</sup> <a href="#">Tinna Stevnsner</a>,<sup>8</sup> <a href="#">Vilhelm A. Bohr</a>,<sup>8,9</sup> <a href="#">P. Eline Slagboom</a>,<sup>5,6</sup> <a href="#">Almut Nebel</a>,<sup>4</sup> <a href="#">James W. Vaupel</a>,<sup>1,10</sup> <a href="#">Kaare Christensen</a>,<sup>1,2</sup> <a href="#">Matt McGue</a>,<sup>1,11</sup> and <a href="#">Lene Christiansen</a><sup>1,2</sup> Human Longevity and Variation in</p>

			d'identification des polymorphismes universels de longévité.	GH/IGF-1/Insulin Signaling, DNA Damage Signaling and Repair and Pro/antioxidant Pathway Genes: Cross Sectional and Longitudinal Studies ; <u>Exp Gerontol.</u> 2012 May; 47(5): 379–387.
<b>rs2922126</b>			Un total de 180 cas et 732 témoins appariés selon l'âge ont été identifiés à partir de la base de données prospective de la biobanque MyCode, puis liés au système d'information sur les décisions cliniques, n'ont rapportés aucune association avec le risque du cancer du sein	<u>Xiaowei Sherry Yan, Jill Barnholtz-Sloan, Xin Chu, Ling Li, Ryan Colonie, Jessica Webster, Diane Smelser, Nikitaban Patel, Jeffery Prichard, and Azadeh Stark</u> . Adiposity, inflammation, genetic variants and risk of postmenopausal breast cancer findings from a prospective-specimen-collection, retrospective-blinded-evaluation (PRoBE) design approach ; <u>Springerplus.</u> 2013; 2: 638.