

Université de Montréal

Localisation, régulation et fonction du récepteur rénal du facteur de libération de
l'hormone de croissance chez le rat

par
Chantale Boisvert

Département de biochimie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à La Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor
en Biochimie

Janvier 2003

©, Chantale Boisvert, 2003



W
4
U58
2003
v. 039

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.


Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:
Localisation, régulation et fonction du récepteur rénal du facteur de libération de
l'hormone de croissance chez le rat.

présenté par:
Chantale Boisvert


a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Daniel Skup
président-rapporteur

Dr Pierrette Gaudreau
directrice de recherche

Dr Huy Ong
membre du jury

Dr Alain Fournier
membre externe



I. RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS FRANÇAIS

Le récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH-R) est principalement retrouvé dans les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure où la liaison du GHRH provoque la synthèse et la sécrétion de l'hormone de croissance, de même que la prolifération et différenciation des somatotropes. L'ARNm du GHRH-R a également été détecté dans plusieurs autres tissus dont le rein qui contient les niveaux extrahypophysaires les plus élevés. Cependant, aucune étude n'a été menée sur sa localisation spécifique, sa régulation et sa fonction.

Les présents résultats mettent en évidence la présence d'un GHRH-R rénal fonctionnel puisqu'une stimulation au GHRH de cellules semi-purifiées d'anse de Henlé (aH) provoque son internalisation et une régulation négative de son expression. Des études de protection à la RNase ont permis de déterminer que le GHRH-R est principalement exprimé dans l'aH mince de la médulla rénale. De plus, des études immunocytochimiques ont permis d'observer une localisation spécifique du GHRH-R dans la partie ascendante mince de l'aH, laquelle est impliquée principalement dans la réabsorption du chlore.

Au cours du développement, les niveaux d'ARNm du GHRH-R médullaire sont maximaux entre 30 et 70 jours, ce qui coïncide avec l'établissement de la capacité à concentrer l'urine. Ce patron d'expression du GHRH-R est différent dans l'hypophyse, où les niveaux d'ARNm du GHRH-R sont élevés pendant la période périnatal suggérant une contribution du GHRH-R à la prolifération et

différenciation cellulaire des somatotropes. Au cours du vieillissement, les niveaux d'ARNm du GHRH-R médullaire sont diminués alors qu'ils demeurent inchangés dans l'hypophyse. Ces résultats indiquent une régulation tissu-spécifique et suggèrent de nouveaux rôles du système GHRH-GHRH-R dans le rein.

L'étude de la régulation *in vivo* du GHRH-R suite à un diabète de type-1 d'une durée de 2, 21 et 60 jours montre une régulation négative précoce, suivi d'un rétablissement partiel des niveaux d'ARNm du GHRH-R médullaire, suggérant un rôle du GHRH-R dans la prolifération cellulaire. De plus, la régulation *in vivo* de l'expression du GHRH-R de la médulla, suite à une diète riche en sel ou d'une restriction hydrique, met en évidence une régulation différentielle des niveaux d'ARNm du GHRH-R de la médulla selon la durée de la diète. Par ailleurs, une absence de modulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R par la restriction hydrique suggère l'implication du GHRH-R rénal dans l'équilibre ionique. Une régulation tissu-spécifique a également été observée entre le GHRH-R rénal et hypophysaire dans ces trois conditions physiopathologiques. L'ensemble de ces résultats permet de suggérer que le GHRH-R rénal de l'aH mince ascendante puisse jouer un rôle dans la prolifération/spécialisation cellulaire de cette partie du néphron par son implication dans l'établissement de la capacité à concentrer l'urine ou dans le transport ionique par la régulation spécifique de l'activité ou la synthèse de canaux ioniques tel que le canal à chlore, CIC-k1.

Mots clés: GHRH-R, anse de Henlé, hypophyse antérieure, développement, vieillissement, diabète, diète riche en sel, restriction hydrique, prolifération cellulaire, transport ionique.

II. RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS ANGLAIS

The growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R) is mainly localized in the somatotroph cells of the anterior pituitary where the binding of GHRH allows the synthesis and secretion of the growth hormone as well as their proliferation/differentiation. GHRH-R was detected in many tissues of which the kidney contains highest extrapituitary GHRH-R mRNA levels. However, no study has been undertaken to characterize its specific localization, regulation and function in this tissue.

The present results led to the identification of a functional renal GHRH-R since a stimulation of semi-purified Henle's loop (HI) cells, with GHRH, allows its internalization and a down-regulation of its expression. RNase protection assay studies allowed localizing the GHRH-R mRNA mainly in thin HI cells of the renal medulla. Immunocytochemistry studies allowed the specific localization of GHRH-R in the ascending thin limb of HI cell, which is mainly involved in chloride transport.

During development, the renal GHRH-R mRNA levels are highest between 30 and 70 days of age, which parallels the development of the capacity to concentrate urine. This expression profile is different from that in the pituitary where GHRH-R mRNA levels are elevated during the perinatal period, suggesting a role in cellular proliferation/differentiation of somatotrophs. In the course of aging, GHRH-R mRNA levels are decreased in the renal medulla but remained unchanged in the pituitary. These results indicate a tissue-specific regulation and

suggest new roles for the GHRH-GHRH-R system in the kidney.

The *in vivo* study of renal GHRH-R regulation following 2-, 21- and 60-day type-1 diabetes showed an early down-regulation followed by a partial recovery of GHRH-R mRNA levels, suggesting a role of GHRH-R in cellular proliferation. Moreover, the *in vivo* regulation of renal GHRH-R expression during a high-salt diet or a water deprivation revealed that GHRH-R mRNA levels are differently regulated according to the length of the diet. Moreover, an absence of modulation of GHRH-R mRNA levels following a water deprivation suggests an involvement of renal GHRH-R in ion equilibrium. A tissue-specific regulation was also observed between the renal and pituitary GHRH-R receptor in these three physiopathological conditions. Altogether these results suggest that the GHRH-R localized in the ascending thin limb of HI cells could play a role in cellular proliferation/specialization of this part of the nephron by acting on process of maturation of its capacity to concentrate urine or on ion transport by specifically regulating chloride channel activity or synthesis, such as the CIC-k1.

Keywords: GHRH-R, Henle's loop, anterior pituitary, development, aging, diabetes, high-salt diet, water deprivation, cellular proliferation, ion transport.

III. TABLE DES MATIÈRES

I.	Résumé et mots clés français.....	i
II.	Résumé et mots clés anglais.....	iii
III.	Table des matières.....	v
IV.	Liste des figures.....	ix
IV.	Liste des tableaux.....	xii
V	Liste des abréviations.....	xiii
VI.	Liste des acides aminés.....	xvii
VII.	Remerciements.....	xviii
1.	INTRODUCTION	1
1.1	Facteur de libération de l'hormone de croissance.....	2
1.1.1	Isolation et structure du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	2
1.1.2	Structure du gène et du précurseur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	3
1.1.3	Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	4
1.1.4	Régulation de l'expression du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	5
1.1.5	Localisation et rôles du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	7
1.2	Récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	12

1.2.1	Structure du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	13
1.2.2	Isoformes du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	14
1.2.3	Structure du gène du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	20
1.2.4	Localisation du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	23
1.2.5	Voies de signalisation intracellulaires du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	24
1.2.6	Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	27
1.2.7	Régulation de l'expression du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	29
1.2.8	Rôle du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	37
1.3	Le rein comme tissu cible de la GH et de l'IGF-I.....	38
1.3.1	Physiologie du néphron.....	38
1.3.2	L'axe GH-IGF-1 rénal.....	45
1.3.2.1	Localisation du récepteur de la GH, de l'IGF-1 et son récepteur dans le rein.....	45
1.3.2.2	Rôles potentiels de la GH et de l'IGF-1 dans le rein	47
1.3.2.2.1	Réabsorption de phosphate.....	47
1.3.2.2.2	Croissance compensatoire.....	47

1.3.2.2.3	Néphrectomie unilatérale.....	48
1.3.2.2.4	Diabète.....	49
1.3.2.2.5	Régénération tubulaire.....	52
1.4	Le récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	53
1.4.1	Localisation du récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	53
1.4.2	Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance....	53
1.5	Justification de l'étude et objectifs.....	55
2.	MANUSCRITS	59
2.1	Boisvert C, Pare C, Veyrat-Durebex C, Robert A, Dubuisson S, Morel G, Gaudreau P 2002 Localization and regulation of a functional GHRH receptor in the rat renal medulla. Endocrinology 143:1475-1484.....	60
2.2	Boisvert C, Veyrat-Durebex C, Strecko J, Gaudreau P 2002 Localization of the rat growth hormone-releasing hormone receptor in the loop of Henle and its tissue-specific regulation by high dietary salt intake but not water deprivation. Soumis à Endocrinology.....	111

2.3	Strecko J, Boisvert C, Robert A, Gaudreau P 2002 Tissue-specific regulation of pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor mRNA levels in type-I diabetic rats. Soumis à Endocrinology.....	157
3.	DISCUSSION	196
4.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	215
5.	BIBLIOGRAPHIE	218

IV. LISTE DES FIGURES

1. Introduction

Figure 1 : Structure du récepteur de rat du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	14
Figure 2 : Voies de signalisation intracellulaire dans les somatotropes en réponse au GHRH.....	25
Figure 3 : Schéma de l'appareil néphrologique chez le rat.....	44

2. Localization and regulation of a functional growth hormone-releasing hormone receptor in the rat renal medulla

Figure 1. Northern blot autoradiographic representation of pituitary (P) and renal medulla (M) GHRH-R mRNA transcripts.....	97
Figure 2. <i>In situ</i> localization of GHRH-R mRNA in the rat kidney.....	98
Figure 3. Quantification of GHRH-R mRNA levels in the rat kidney.....	100
Figure 4. GHRH-R mRNA levels in purified CD and HL cells and in total medulla.....	101
Figure 5. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla of the developing male rat.....	102
Figure 6. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla of the developing female rat.....	104
Figure 7. GHRH-R mRNA levels in the anterior pituitary of the developing	

male rat.....	106
Figure 8. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla of aging male rat.....	107
Figure 9. GHRH-R mRNA levels in semi-purified HL cells treated with GHRH....	109
Figure 10. Visualization of GHRH-R in semi-purified HL cells with the anti-GHRH-R(392-404) antibody and Fluo-GHRH.....	110
3. Localization of the rat growth hormone-releasing hormone receptor in the loop of Henle and its tissue-specific regulation by high dietary salt intake and water deprivation	
Figure 1. GHRH-R mRNA levels in purified thick and thin HL and total medulla.....	146
Figure 2. Visualization of GHRH-R in thin HL cells with the anti-GHRH-R(392-404) antibody.....	147
Figure 3. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla after 2-day 8% NaCl diet.....	148
Figure 4. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla after 7-day 8% NaCl diet.....	149
Figure 5. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla after 14-day 8% NaCl diet.....	151
Figure 6. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla after 3-day water-deprivation.....	152
Figure 7. GHRH-R mRNA levels in the pituitary after 2-day 8% NaCl diet.....	153
Figure 8. GHRH-R mRNA levels in the pituitary after 7-day 8% NaCl diet.....	154

Figure 9. GHRH-R mRNA levels in the pituitary after 14-day 8% NaCl diet.....	155
Figure10. GHRH-R mRNA levels in the pituiatry after 3-day water-deprivation...	156

4. Tissue-specific regulation of pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor mRNA levels in type-I diabetic rats

Figure 1. GHRH-R mRNA levels in the anterior pituitary from control (C) and diabetic male rats, 2 days post-STZ administration.....	187
Figure 2. GHRH-R mRNA levels in the anterior pituitary from control (C) and diabetic male rats, 21 days post-STZ administration.....	189
Figure 3. GHRH-R mRNA levels in the anterior pituitary from control (C) and diabetic male rats, 60 days post-STZ administration.....	191
Figure 4. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla from control (C) and diabetic male rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration.....	193

V. LISTE DES TABLEAUX

- 1. Localization of the rat growth hormone-releasing hormone receptor in the loop of Henle and its tissue-specific regulation by high dietary salt intake and water deprivation**

Tableau 1. Physiological parameters of rats following a 2-, 7-, or 14-day high-salt diet or a 3-day water-deprivation.....145

- 2. Tissue-specific regulation of pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor mRNA levels in type-I diabetic rats**

Tableau 1. Body weight, kidney wet weight, food and water intakes and biochemical parameters of rats with short-term (2 and 21 days) and long-term (60 days) STZ-induced diabetes.....185

VI. LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	:acide aminé
ADN	:acide désoxyribonucléique
aH	:anse de Henlé
AMPc	:adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
ANP	:facteur natriurétique auriculaire
AP-1	: "activator protein-1"
ARN	:acide ribonucléique
ARNm	:acide ribonucléique messenger
BHK	:lignée de cellules rénales de bébé hamster
Brn-2	:facteur de transcription "brain-2"
BSA	:albumine bovine sérique
BW	:poids corporel
Ca ²⁺	:calcium
CD	:tube collecteur
cDNA	:ADN complémentaire
C/EBP α	: "CCAAT/enhancer binding protein"
CHO	:cellules d'Ovaires de Hamster Chinois
COS	:lignée de cellules fibroblastiques rénales de singe
CREB	:facteur de transcription se liant à l'élément de réponse de l'AMPc
DAG	:1,2-diacylglycérol
DBA	:agglutinine de <i>Dolichos biflorus</i>
db-cAMP	: "cyclic N6-2'-O-dibutyryladénosine-3',5'-monophosphate"
DMSO	:diméthylsulfoxyde

dw	:nain
ER	:récepteur aux estrogènes
EMSA	:essai de mobilité électrophorétique retardée
Ets-1	: "E26 transformation-specific-1"
FITC	:isothiocyanate de fluorescéine
FSH	:hormone folliculostimulante
GAPDH	:glycéraldehyde-3-phosphate-déshydrogénase
GH	:hormone de croissance
GHF-1	: "growth hormone factor-1"
GH-R	:récepteur de l'hormone de croissance
hGHRH	:facteur de libération de l'hormone de croissance humain
rGHRH	:facteur de libération de l'hormone de croissance de rat
GHRH	:facteur de libération de l'hormone de croissance
GHRH-R	:récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance
GIP	:peptide inhibiteur gastrique
GLP-1	:peptide analogue au glucagon de type 1
G _s	:protéine G stimulatrice
GPCR	:récepteurs couplés aux protéines G
GRF	:facteur de libération de l'hormone de croissance
GTP	:guanosine triphosphate
HEPES	:acide <i>N</i> -2-hydroxyéthylpipérazine- <i>N'</i> -2-éthane sulfonique
HL	:anse de Henlé
IGF-I	:facteur insulinique de croissance de type I
IP ₃	:1,4,5-inositol phosphate

IRS-1	: "insuline receptor substrate-1"
kb	: kilo paire de bases
kDa	: kilodalton
MAPK	: "mitogen-activated protein kinase"
MEK-1	: MAP/ERK Kinase I
MOPS	: acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique
MtT/S	: lignée tumorale hypophysaire
Na ⁺	: sodium
NB	: buvardage Northern
NPY	: neuropeptide Y
NU	: néphrectomie unilatérale
NF- κ B	: facteur nucléaire- κ B
Oct-1	: "octamer-binding protein"
PACAP	: peptide hypophysaire stimulateur de l'adénylyl cyclase
PAO	: oxyde de phénylarsenic
pb	: paire de base
PBS	: tampon phosphate
PI3K	: "tetradecanoyphorbol acetate"
poly A RNA	: ARN polyadénylé
PKA	: "protein kinase A"
PKC	: "protein kinase C"
PMA	: "4 beta-phorbol 12-myristate 13-acetate"
RPA	: protection à la RNase
RT	: température de la pièce
RT-PCR	: transcription inverse et amplification en chaîne par polymérase

SDS	:dodécyl sulfate de sodium
SNC	:système nerveux central
SP-1	:"stimulating protein-1"
SSC	:"standard saline citrate"
TPA	:acétate de tétradécanoylphorbol
TRH	:facteur de libération de la thyroïdolibérine
RT-PCR	:transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par une polymérase
SRIF	:somatostatine
STZ	:streptozotocine
U	:unité
USF	:"upstream regulatory factor"
VIP	:peptide intestinal vasoactif
vol	:volume

VII. LISTE DES ACIDES AMINÉS

Ala	:alanine
Arg	:arginine
Asn	:asparagine
Asp	:acide aspartique
Gln	:glutamine
Glu	:acide glutamique
Gly	:glycine
His	:histidine
Ile	:isoleucine
Leu	:leucine
Lys	:lysine
Met	:méthionine
Nle	:norleucine
Phe	:phénylalanine
Ser	:sérine
Thr	:thréonine
Tyr	:tyrosine
Val	:valine

VIII. Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Dr Pierrette Gaudreau, ma directrice de recherche, qui m'a accueillie dans son laboratoire dans le cadre de mon doctorat. Mon passage dans ce laboratoire fut une expérience des plus enrichissantes. Merci Pierrette pour ta disponibilité, ta rigueur scientifique et tes nombreux conseils judicieux. Merci pour la confiance que tu m'as témoigné ainsi que ton aide constante dans toutes les étapes de mon projet et des articles. Finalement merci de m'avoir permis de travailler sur un projet si excitant.

Merci aux membres de mon jury d'évaluation de thèse de doctorat, Dr Daniel Skup, Dr Huy Ong et Dr Alain Fournier, d'avoir accepté cette invitation, vos commentaires et suggestions ont grandement bonifié cette thèse.

Mes remerciements s'adressent également au Réseau en Géro-nto-Gériatrie du FRSQ et à la Faculté des études supérieures pour les bourses qu'ils m'ont accordées.

Merci à chacun des membres du laboratoire pour leur précieuse aide tout au long de mon projet et plus particulièrement à Julie Strecko et Sophie Dubuission pour leur collaboration professionnelle, à Alma Robert pour son oreille attentive à mes mille et une questions, à Caroline Paré pour sa complicité développée au cours des nombreuses expériences partagées et finalement à Christelle "Toune" Veyrat-Durebex et Luc Pomerleau pour avoir partagé et enrichi mon quotidien.

Merci à toute ma famille, ma belle-famille et mes ami(e)s pour leur présence et leur appui. De très sincères remerciements à mes parents, Cécile & Jacques, qui m'ont toujours soutenue dans tous mes projets. Vous êtes des parents tout simplement formidables! Merci de m'aider à surmonter les obstacles, pour vos encouragements inconditionnels ("T'es capable!") et votre amour si précieux.

Finalement, un gros merci à mon conjoint, Louis, pour avoir partagé ma vie d'étudiante avec tant de patience et de compréhension. Merci pour ton support et ta présence dans les bons et moins bons moments. Merci surtout d'avoir toujours cru en moi ("Moi, je t'engagerais!").

1.0 INTRODUCTION

1.1 Facteur de libération de l'hormone de croissance

1.1.1 Isolation et structure du facteur de libération de l'hormone de croissance

Le facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH) humain a été isolé en 1982, par deux équipes indépendantes, à partir de tumeurs pancréatiques de patients atteints d'acromégalie (1, 2). L'équipe de Vale a isolé un peptide de 40 acides aminés (aa), le GHRH(1-40)OH, tandis que Guillemin a isolé et caractérisé, en plus du peptide de 40 aa, deux peptides de 44 et 37 aa, soit le GHRH(1-44)NH₂ et le GHRH(1-37)OH. Puisque leur structure primaire était identique, les deux formes les plus courtes ont été identifiées comme étant des produits de dégradation du GHRH(1-44)NH₂ (3, 4). Des études *in vivo* ont démontré que ces trois peptides permettaient d'une façon équipotente la stimulation de la sécrétion de l'hormone de croissance (GH), la séquence bioactive minimale étant constituée des 29 aa de la portion N-terminale (1, 2). Les formes de 40 et 44 aa ont subséquentement été observées dans l'hypothalamus humain (3-5). Le GHRH est composé de 42 aa chez la souris (6, 7), 43 aa chez le rat (8, 9) et 44 aa chez le porc (10), le bœuf (11), le mouton (12) et la chèvre (12). Les peptides GHRH(1-42) de souris et GHRH(1-43) de rat présentent 62 et 67% d'homologie avec le GHRH(1-44) humain, respectivement (6-9). La portion C-terminale est amidée sauf chez les rongeurs où elle comporte une fonction carboxylique libre. Le GHRH fait partie d'une famille de peptides regroupant le peptide intestinal vasoactif (VIP), le peptide hypophysaire stimulateur de l'adénylyl cyclase (PACAP), le glucagon, la sécrétine, le peptide inhibiteur gastrique (GIP), le peptide histidine isoleucine (PHI)

et le peptide analogue au glucagon de type 1 (GLP-1). Une forte homologie est remarquée entre les membres de cette famille, particulièrement dans la portion N-terminale, laquelle inclue les 32 premiers acides aminés du GHRH. Cette région est importante dans le maintien de l'activité biologique du peptide (13).

1.1.2 Structure du gène et du précurseur du facteur de libération de l'hormone de croissance

Le gène du GHRH a été localisé sur le chromosome 20 chez l'humain (8) (14) et le chromosome 2 chez la souris (15). Le précurseur du GHRH est réparti sur 4 exons. L'ARNm du préproGHRH contient deux exons supplémentaires en 5' comportant chacun un site d'initiation de la transcription permettant une expression tissu-spécifique du GHRH dans l'hypothalamus et le placenta (7). En effet, l'utilisation de deux promoteurs distincts localisés sur le même gène permet l'obtention de deux transcrits différents (8, 16). Un seul site d'initiation de la traduction a été identifié dans l'ARNm du GHRH hypothalamique et placentaire signifiant que la protéine est identique dans les deux tissus. La portion 5' non-traduite de l'ARNm du préproGHRH hypothalamique contient des éléments TATA et de type CCAAT impliqués dans l'initiation de la transcription. Cette région est hautement conservée chez l'humain, la souris et le rat. La séquence 5' non-traduite de l'ARNm du préproGHRH placentaire ne contient pas ces éléments (17). Cependant plusieurs séquences similaires aux sites de liaison consensus pour les facteurs de transcription Oct-1 (octamer-binding protein-1) sont présentes, suggérant l'implication de facteurs à domaine POU (Pit-Oct-Inc) dans l'expression spécifique de ce gène au niveau du placenta (18). Le GHRH est synthétisé sous forme d'un précurseur de 108 aa chez l'humain, 103 aa chez la souris et 104 aa

chez le rat. Le préproGHRH est constitué d'un peptide signal, du GHRH(1-44), d'un signal d'amidation et d'un peptide carboxyterminal. La maturation du précurseur est initiée par le clivage du peptide signal et l'action d'endopeptidases qui permettent l'obtention de la forme GHRH(1-45) (19). Subséquemment, la peptidylglycine monooxygénase α -amidante permet la maturation finale du peptide en GHRH(1-44)NH₂ (19). La forme GHRH(1-40)OH est obtenue par l'action d'endopeptidases présentes entre autres dans l'hypothalamus et l'hypophyse (20). La portion C-terminale de la séquence du précurseur varie chez l'humain comparée à celle du rat et de la souris. Cette divergence est due à un épissage alternatif donc à l'introduction dans le GHRH humain d'une séquence intronique absente chez le peptide de rat et de souris (8).

1.1.3 Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du facteur de libération de l'hormone de croissance

L'élucidation de la structure primaire du GHRH a permis l'étude de l'affinité de différents fragments et analogues du GHRH pour son récepteur (GHRH-R). Une étude de structure-affinité de Gaudreau et coll. a permis de déterminer les segments importants lors de la liaison du GHRH à son récepteur. La délétion des acides aminés Tyr¹, Ser⁹, Lys¹², Val¹³, Gly¹⁵, Gln¹⁶ ou Lys¹² diminue drastiquement l'affinité du hGRF(1-29)NH₂. De multiples délétions d'aa dans le segment 13-21 du hGRF(1-29)NH₂ amènent également une perte d'affinité tel qu'observé lors du remplacement des segments 13-15, 16-18 ou 19-21 par un groupement octanoyle. La délétion des aa Asn⁸, Gln²⁴, Asp²⁵, Ile²⁶, Met²⁷ et Ser²⁸ ou Arg²⁹ ont moins d'effet sur l'affinité du ligand à son récepteur tandis que celle des aa Met²⁷ ou Ser²⁸ n'affecte que légèrement l'affinité du hGRF(1-29)NH₂. Ces résultats indiquent que

les acides aminés contenus dans le segment 13-21 sont plus importants que ceux de la région 24-29 pour le maintien d'une haute affinité de liaison ou d'une conformation optimale permettant la liaison du GHRH (21).

Afin de préciser les pharmacophores de liaison et d'activation du GHRH, Lefrancois et Gaudreau ont étudié l'affinité d'analogues du hGHRH(1-29)NH₂ monosubstitués par un stéréoisomère ou une L-alanine. Cette étude a montré que les aa Ala⁴, Val¹³, Ala¹⁹ et Ile²⁶ sont impliqués dans le maintien de la structure du GHRH et permettent une liaison optimale au récepteur alors que les résidus Tyr¹, Asp³, Tyr¹⁰, Arg¹¹, Lys¹², Leu¹⁴, Leu¹⁷, Arg²⁰ et Lys²¹ sont directement responsables de la liaison au récepteur. Les aa Ile⁵ et Phe⁶ apparaissent importants pour la structure du GHRH et sa liaison au récepteur. Finalement, les résidus impliqués dans la liaison au récepteur sont apparemment également requis pour l'activation du récepteur et la production d'AMPc (22). Des études effectuées dans des préparations membranaires de cellules rénales de bébé hamster (BHK) transfectées avec le hGHRH-R ont montré que les résidus Tyr¹⁰, Val¹³, Leu¹⁴, Leu¹⁷, Ala¹⁹ et Arg²⁰ étaient également impliqués dans la liaison au GHRH-R (23).

1.1.4 Régulation de l'expression du facteur de libération de l'hormone de croissance

Le rétrocontrôle négatif de la GH sur l'expression de l'ARNm du GHRH constitue le facteur de régulation le plus important de l'expression du GHRH. Cette régulation a été observée chez des rats hypophysectomisés. En effet, les niveaux d'ARNm du préproGHRH sont augmentés de 3 à 4 fois une semaine suivant une hypophysectomie (24) et normalisés, tel qu'observé chez le rat nain déficient en

GH, suivant une thérapie de remplacement à la GH (24, 25). Les niveaux d'ARNm du préproGHRH sont également augmentés chez la souris *little* dont le GHRH-R hypophysaire comporte une mutation de l'acide aspartique en position 60, ce qui le rend inactif et conduit à une déficience en GH (6).

Par ailleurs, les glucocorticoïdes ont un effet inhibiteur direct sur la synthèse de l'ARNm du préproGHRH dans le noyau arqué (26) tandis que les hormones thyroïdiennes régulent négativement la synthèse du GHRH et sa libération dans l'hypothalamus (27, 28) en partie *via* la régulation de l'expression de la GH (29).

L'expression du GHRH peut également être régulée par des hormones hypothalamiques et des neurotransmetteurs. Des études autoradiographiques et immunohistochimiques ont démontré que les neurones sécrétant le GHRH sont innervées par les axones de neurones sécrétant la thyroïdolibérine (TRH) (30), la substance P, l'enképhaline (31), les catécholamines (32), la somatostatine (31, 33, 34) ou le GHRH lui-même (35, 36). Ceci suggère que ces substances puissent contrôler l'expression et/ou la sécrétion du GHRH.

La régulation de l'expression du GHRH varie selon le sexe. En effet, les niveaux d'ARNm du préproGHRH et du peptide hypothalamique sont plus élevés chez le mâle que la femelle (37). Cette modulation serait reliée aux hormones sexuelles puisque la testostérone augmente et l'estrogène diminue l'expression de l'ARNm du GHRH chez le rat mâle (38, 39).

Le jeûne, l'obésité ainsi que le diabète sont également trois conditions métaboliques qui provoquent une diminution de l'expression de l'ARNm du préproGHRH (40-43). Puisque les niveaux d'ARNm de la GH sont faibles dans ces trois états physiopathologiques, il est suggéré que la régulation de l'expression du GHRH implique plusieurs autres facteurs en plus de la GH (44).

1.1.5 Localisation et rôles du facteur de libération de l'hormone de croissance

Dans le système nerveux central (SNC), le GHRH est synthétisé majoritairement par le noyau arqué de l'hypothalamus. Des études immunocytochimiques ont révélé que le GHRH est également présent dans l'éminence médiane où il est libéré afin d'être transporté à son organe cible, l'hypophyse antérieure, *via* le système porte. La sécrétion du GHRH dans le système porte est épisodique, ce qui contribue à la pulsatilité de la sécrétion de GH (45). Au niveau hypophysaire, la liaison du GHRH à son récepteur permet l'augmentation de la synthèse et de la sécrétion de GH (46). Ces deux phénomènes se produisent toutefois de façon indépendante (47). La somatostatine (SRIF), un peptide hypothalamique synthétisé par le noyau périventriculaire, produit l'effet opposé du GHRH en inhibant la sécrétion de GH (48) et la transcription *in vitro* de son gène (49). La GH, sécrétée par les somatotropes de l'hypophyse antérieure, exerce un rôle anabolique important en stimulant la synthèse protéique et en inhibant le catabolisme protéique et la lipolyse (23, 50-52). La GH exerce une autre action endocrinienne en stimulant, soit directement ou indirectement par l'intermédiaire de l'IGF-1 hépatique, la prolifération et différenciation cellulaire dans plusieurs tissus et organes cibles tels

que les os, les cartilages, les muscles et les viscères (23). La GH stimule la synthèse et la sécrétion d'IGF-1 hépatique (53) et représente le plus puissant sécrétagogue de l'IGF-1 dont la majorité de la concentration circulante provient du foie (54, 55). La stimulation de la synthèse d'IGF-1, par la GH circulante, a également été rapportée au niveau des adipocytes, des chondrocytes et des cellules du tube collecteur où ce facteur de croissance exerce une action autocrine (56, 57).

Le rôle du GHRH dans la croissance a été mis en évidence dans des études cliniques de tumeurs sécrétant le GHRH (58-60) et par des études chez des souris transgéniques surexprimant le GHRH (61, 62). Dans chacun des cas, l'hypersécrétion de GH, l'hyperplasie des somatotrophes et la croissance excessive ont été observées suggérant la participation du GHRH dans la croissance longitudinale. Le GHRH est également impliqué dans la prolifération des cellules somatotropes *in vitro* via une stimulation de l'expression du gène *c-fos* (63, 64).

Des études de colocalisation, à l'aide de techniques radioimmunologiques, immunohistochimiques et d'hybridation *in situ* ont démontré une colocalisation du GHRH avec la neurotensine, la choline-acétyl-transférase (ChAT) et la galanine dans les neurones de la partie ventrolatérale du noyau arqué (65). Ces neuromédiateurs sont tous impliqués dans la sécrétion de GH ce qui suggère une interaction possible avec le GHRH (44, 65). Le GHRH a de plus été colocalisé avec le neuropeptide Y (NPY) dans des neurones de la partie ventromédiane qui ne sont pas reliés à l'éminence médiane ce qui suggère un rôle de

neuromodulateur du GHRH au niveau du SNC (66). Finalement les axones somatostatinerigiques localisés dans le noyau arqué et dans le noyau ventromédial suggèrent une association synaptique avec les neurones du GHRH présents dans ces deux structures (33, 34).

Des projections d'axones GHRHergiques ont également été détectées au niveau de neurones de l'amygdala, une partie du cerveau impliquée dans le contrôle des émotions et la réponse au stress (67). Une libération de GH suite à une stimulation électrique chez le rat et l'humain suggère l'implication du GHRH localisé dans cette partie du cerveau (68, 69). En effet, Cataldine et coll. ont démontré que l'induction d'un stress augmente les niveaux de GHRH au niveau du système porte porte et la sécrétion de GH (70).

Le GHRH est également impliqué dans le contrôle de l'appétit (71). La microinjection de GHRH au niveau central augmente la prise alimentaire durant la phase de lumière et n'a pas d'effet ou diminue la prise alimentaire durant la phase d'obscurité, durant laquelle les rats consomment 80% de leur apport alimentaire quotidien (72). Cependant, l'injection d'un antisérum anti-GHRH dans le noyau suprachiasmatique et la région préoptique médiane à quatre différentes périodes durant les cycles lumière/obscurité supprime la prise alimentaire seulement durant le cycle d'obscurité (73). Le GHRH contribuerait donc à l'augmentation de la prise alimentaire observée au cours de la période d'obscurité et/ou de lumière. La microinjection d'antisérum anti-GHRH a également permis d'observer une action du GHRH sur la sélection des macronutriments chez le rat. En effet, chez les rats immunisés passivement, un blocage de la prise protéique est observé dans la

période d'obscurité alors que la prise de carbohydrates n'est pas affectée (74). Ainsi le GHRH agirait sur la prise alimentaire en tant que neuromodulateur et/ou neurotransmetteur puisque la région de l'hypothalamus sensible au GHRH, le noyau suprachiasmatique et la région préoptique, n'est pas reliée au système porte donc cet effet serait indépendant de la GH (73). Un effet du GHRH sur le sommeil a également été démontré (75-79). Suite à une injection intracérébroventriculaire ou intrahypocampique de GHRH, une augmentation du sommeil profond (phase d'ondes lentes) a été démontrée (75, 80). De plus, le sommeil a été réduit chez des rats lorsque l'action du GHRH a été inhibée par un antagoniste ou un anticorps anti-GHRH (77, 81). Inversement, l'ARNm du GHRH est diminué dans l'hypothalamus lors d'une privation en sommeil (78). La région préoptique de l'hypothalamus antérieur serait impliquée dans la régulation du sommeil par le GHRH puisqu'une injection intrapréoptique du peptide ou d'un antagoniste du GHRH, provoque une augmentation ou diminution de la durée et de l'intensité du sommeil REM (mouvements oculaires rapides) (79). Cet effet serait également indépendant de la GH (44).

Le GHRH est retrouvé dans plusieurs autres organes que le cerveau. L'ARNm du préproGHRH et le GHRH sont observés dans le placenta majoritairement au niveau du cytotrophoblaste chez le rat (82) et des cellules du trophoblaste et dans le labyrinthe placentaire (7) chez la souris. L'ARNm du préproGHRH et sa protéine ont également été observés dans le placenta humain (83). L'expression du préproGHRH est régulée durant la grossesse chez le rat (84) et la souris (7). Chez la souris, les niveaux de l'ARNm du préproGHRH augmentent durant toute la durée de la grossesse, atteignant un maximum

quelques jours avant la parturition (7). Dans ce tissu, le GHRH pourrait participer à la régulation de la sécrétion de la GH fœtale durant la période embryonnaire (17) ou à la régulation paracrine des fonctions placentaires, telle que la sécrétion du lactogène placentaire (85). Le GHRH placentaire pourrait également réguler la production d'autres hormones placentaires et exercer des effets directs sur la croissance et la différenciation cellulaire du fœtus (86). Chez l'humain et le rat, l'ARNm du preproGHRH et le GHRH sont présents au niveaux de l'ovaire (87) et du testicule (83, 88, 89), où le GHRH agirait possiblement comme facteur de régulation propre aux gonades (90, 91). Dans des cultures cellulaires de granulosa, le GHRH augmente la stéroïdogénèse stimulée par la FSH (hormone folliculostimulante) chez la rate (90). Il stimule également la prolifération de ce type cellulaire chez la vache (92). Dans le testicule de rat, le GHRH est retrouvé dans les cellules de Leydig (89) et les cellules germinales (93). Le GHRH permettrait de moduler la stéroïdogénèse stimulée par les gonadotrophines dans les cellules de Leydig en culture et de stimuler la production d'AMPc et l'expression du gène *c-fos* dans les cellules de Sertoli en culture (89, 94). Vu l'existence d'une barrière hémato-testiculaire, le GHRH agirait comme un facteur autocrine ou paracrine (95). La taille de l'ARNm du GHRH au niveau des testicules et de l'ovaire est plus élevée que celle de l'hypothalamus et du placenta (7, 87, 89), suggérant la possibilité d'un promoteur alternatif ou d'un processus d'épissage alternatif (18).

Le GHRH (ARNm et peptide) est retrouvé dans le pancréas (96, 97) et le système gastro-intestinal (96-98). Le GHRH pancréatique, localisé au niveau des îlots, permettrait la sécrétion d'hormones du pancréas endocrine et exocrine (99-

102). Dans l'intestin, le GHRH est localisé plus précisément dans la muqueuse épithéliale du jéjunum et du duodénum où il serait impliqué dans la prolifération des cellules épithéliales de l'intestin (103).

Le GHRH (ARNm et peptide) est également détecté dans le thymus et la rate, plus particulièrement dans les lymphocytes (104, 105) où il serait impliqué dans la prolifération lymphocytaire. Puisqu'un axe GHRH-GH fonctionnel y est présent, le GHRH agirait indirectement *via* un mécanisme dépendant de la GH.

Finalement une étude par RT-PCR (transcription inverse-amplification en chaîne par polymérase) a démontré la présence de l'ARNm du GHRH dans plusieurs tissus tels que l'hypophyse, le coeur, le poumon, l'intestin grêle, la glande surrénale, le muscle squelettique, le cortex cérébral, le tronc cérébral et le rein (96). Il est suggéré que le GHRH rénal puisse être impliqué dans l'oxygénation médullaire tel que proposé pour plusieurs hormones, peptides et neuromédiateurs (106). En effet, la vasopressine, l'endothéline, les prostaglandines, l'angiotensine et la dopamine modulent le flux sanguin et le transport tubulaire dans les anses épaisses de la médulla suggérant un contrôle neuroendocrinien de l'oxygénation de la médulla (96).

1.2 Récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

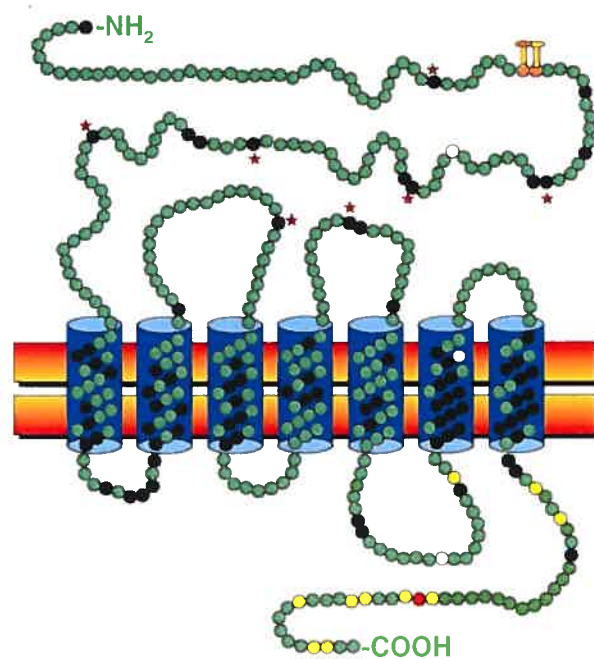
1.2.1 Structure du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

Le GHRH-R hypophysaire a été cloné chez le rat (107, 108), la souris (108), l'humain (107, 109), le porc (110), le bœuf (111) et le mouton (111). La structure de l'ADNc de rat prédit une protéine de 423 aa correspondant à un poids moléculaire de 47kDa. Le récepteur de rat partage 93.4, 81.7, 81.4, 79.5, 75.9% d'homologie avec les récepteurs de souris, d'humain, de porc, de bœuf et de mouton, respectivement (111). De plus, un pourcentage élevé d'homologie est retrouvé entre le récepteur de bœuf et de mouton (92.5%) (111). Le GHRH-R fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, plus spécifiquement de la sous-famille B-III comprenant les récepteurs du VIP (112), de la sécrétine (113), du glucagon (114), du GLP-1 (115), du GIP (116) et du PACAP (117). Le GHRH-R de rat partage 35 et 40% d'homologie avec les récepteurs de la sécrétine et du VIP, respectivement (107). Le GHRH-R possède les caractéristiques des récepteurs couplés aux protéines G, soit sept domaines transmembranaires, des résidus cystéines dans les deuxième et troisième boucles extracellulaires qui formeraient des ponts disulfures et une cystéine dans la partie C-terminale intracytoplasmique pouvant être palmitoylée (86, 118) (Fig. 1). Il comporte également au moins un site de N-glycosylation dans la partie N-terminale, des sites potentiels de phosphorylation dans la troisième boucle cytoplasmique et la partie C-terminale et plusieurs résidus hautement conservés dans les domaines transmembranaires (86). Le GHRH-R comprend un long domaine N-terminal extracellulaire renfermant 6 cystéines conservées (Fig. 1).

1.2.2 Isoformes du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

L'analyse de l'ARNm de différents tissus chez le rat par buvardage Northern a mis en évidence la présence de deux transcrits de ~2.5 et ~4 kb dans l'hypophyse et du transcrit de 4kb dans la médulla rénale (96, 107, 119). Le transcrit de 2.5kb représente la forme prédominante dans l'hypophyse de rat jeune (107).

Figure 1 : Structure du récepteur de rat du facteur de libération de l'hormone de croissance.



-  :Site potentiel de N-glycosylation
-  :Site potentiel de palmitoylation
-  :AA conservés dans la sous-famille B-III
-  :Sites potentiels de phosphorylation
-  :Cystéines conservées

Un ADNc du rGHRH-R, correspondant à une protéine mature de 423 aa, a été identifié par Mayo (1992) et Lin et coll. (1992) et constitue la forme principale du GHRH-R dans l'hypophyse antérieure (107, 108). Cette forme peut lier le GHRH avec une haute affinité et permettre, suite à l'activation du récepteur, la production d'AMPc intracellulaire (120). Mayo et Lin et coll. ont isolé une isoforme de 464 aa contenant une insertion de 41 aa dans la troisième boucle cytoplasmique précédant le sixième passage transmembranaire (107, 108). Ce point d'insertion correspond à une jonction intron-exon, ce qui suggère qu'un épissage alternatif de l'ARN soit à l'origine de cette isoforme longue du récepteur (107). Cette isoforme du GHRH-R de rat a également été détectée dans la lignée tumorale hypophysaire MtT/S et serait prédominante dans certaines cellules MtT/S, suggérant que l'épissage alternatif puisse être régulé (120). Des études fonctionnelles ont démontré que cette isoforme liait le GHRH mais qu'elle ne permettait pas une transmission intracellulaire de signal via la voie de l'AMPc (120).

Zeitler et coll. ont observé par RT-PCR, en plus de l'isoforme de 464 aa, la présence d'une autre isoforme du GHRH-R dans l'hypophyse de rat nain et de rat normal (121). L'isoforme contient l'insertion dans la troisième boucle intracytoplasmique décrite précédemment mais diffère à son extrémité C-terminale. En effet, elle contient une délétion de 131pb (1279-1408) provoquant un changement du cadre de lecture se traduisant par la substitution des cinq derniers aa de l'extrémité C-terminale et par l'addition de dix-sept nouveaux aa. Cette isoforme de 480 aa, correspondant à une protéine de 42kDa, est fonctionnelle et permet une augmentation de l'AMPc intracellulaire suite à une

stimulation au GHRH lorsqu'il est exprimé dans la lignée de cellules fibroblastiques rénales de singe (COS) ou cancéreuses humaines (Hela) (121).

En plus de la forme de 423 aa, Lin et coll. ont isolé deux isoformes du GHRH-R chez la souris (108). Les deux isoformes du récepteur montrent soit une insertion au même site que chez le rat ou une délétion des nucléotides codant pour la première boucle extracellulaire. La localisation de l'ARNm de ces isoformes a spécifiquement été observée par protection à la RNase (RPA) dans l'hypophyse de souris. La transfection du récepteur de souris comportant l'insertion a permis de confirmer sa capacité à lier le GHRH ainsi qu'à stimuler la production d'AMPc (108).

Chez l'humain, un ADNc du GHRH-R codant pour une protéine de 423aa a été identifié (107, 109, 122, 123). Lorsque exprimé dans la lignée cellulaire rénale embryonnaire humaine 293 (HEK 293), le GHRH-R humain conserve la capacité à lier le GHRH et son activation par une stimulation au GHRH permet une augmentation de la production d'AMPc (107). D'autres études ont démontré que l'expression transitoire de cet ADNc dans les cellules COS permet une liaison spécifique, saturable et de haute affinité du GHRH (109). De plus, la liaison du GHRH stimule la production d'AMPc et l'utilisation d'un antagoniste du GHRH abolit cet effet, démontrant la spécificité d'action (109).

Hashimoto et coll. ont identifié dans des hypophyses et des adénomes hypophysaires humains trois transcrits d'ARNm du GHRH-R correspondant à des tailles moléculaires de 2.0, 2.8 et 4.5 kb (123). Le transcrit de 2.0 kb correspond

au peptide de 423 aa et constitue la forme prédominante retrouvée dans les hypophyses normales. Les transcrits de 2.8 et 4.5 kb sont présents en faibles concentrations. Toutefois, dans certains adénomes hypophysaires sécrétant la GH, ces derniers deviennent prédominants. En utilisant une approche par RT-PCR, des insertions de 438 et 561 pb en position 1025 ont été mises en évidence dans la région comprise entre la troisième boucle cytoplasmique et le sixième passage transmembranaire (122, 123). Des transcrits de 2.8 et 4.5 kb ont été détectés à l'aide de la sonde correspondant à l'insertion de 561 pb par buvardage Northern. Ces insertions, provenant de l'épissage alternatif de l'ARNm, contiennent un codon stop provoquant la terminaison prématurée de la traduction avant le sixième passage transmembranaire (338 aa et 325 aa au lieu de 423 aa). Des études de transfection dans des cellules COS avec le transcrit de 4.5 kb ont démontré que l'isoforme correspondante ne permet pas, suite à la stimulation au GHRH, la transmission du signal au niveau intracellulaire. Cependant, des études de cotransfection avec cet ADNc et celui du récepteur natif de 423 aa ont démontré une diminution de la production d'AMPc stimulée par le GHRH obtenu avec le récepteur natif seul (124). Ces résultats suggèrent que cette isoforme tronquée agirait comme dominant négatif et modulerait la production d'AMPc (124).

Quatre isoformes du GHRH-R humain ont été identifiées dans des lignées cellulaires cancéreuses humaines prostatiques (LNCaP) et pancréatiques (MiaPaC-2) où une inhibition de la prolifération cellulaire est observée suite à une stimulation en présence d'antagonistes du GHRH (125). Les transcrits d'ARNm de ces quatre isoformes (SV₁, 2, 3, 4) ont comme caractéristiques communes

l'absence des trois premiers exons et la présence d'une portion de l'intron trois dans leur séquence nucléotidique. La structure de SV_{2, 3, 4} diffère largement de celle du GHRH-R identifiée par Gaylinn (1993) et Mayo (1992). D'une part, l'absence des exons 5, 6 et/ou 7 provoque, chez deux isoformes (SV_{2,4}), la terminaison précoce de la traduction due à la présence d'un codon stop dans l'exon huit. D'autre part, le site d'initiation de la traduction de l'isoforme SV₃ étant déphasée, la séquence protéique obtenue diffère complètement de celle du GHRH-R identifiée par Gaylinn (1993) et Mayo (1992). La dernière isoforme (SV₁) partage plus de 99% d'identité avec la séquence du gène humain correspondant aux exons 4-13. La seule portion de l'ADNc qui diffère correspond aux 334 pb de l'intron 3 à l'extrémité 5'. Des essais de liaison effectués dans les lignées cellulaires cancéreuses, à partir desquelles ont été isolées les différentes isoformes, ont démontré l'existence d'un site de liaison à haute affinité en présence d'antagonistes du GHRH et à plus basse affinité en présence d'agonistes du GHRH. Ces résultats suggèrent que ces isoformes puissent médier l'effet antiprolifératif d'antagonistes du GHRH dans différents cancers (125, 126). La transfection de fibroblastes de souris avec l'isoforme SV₁ a démontré que la stimulation de ce récepteur avec un agoniste ou antagoniste du GHRH permet une augmentation et une inhibition de la prolifération, respectivement. Comme l'effet antiprolifératif observé avec l'antagoniste du GHRH n'a pu être renversé en présence de GHRH, il a été postulé qu'une isoforme du GHRH-R puisse être responsable des effets antiprolifératifs médiés par un antagoniste du GHRH dans les cellules cancéreuses (127).

Un polymorphisme du gène du GHRH-R a été décrit par Adams et coll. où le

codon 57 GCG (Ala) est remplacé par AGC (Thr) dans des somatotrophinomes humains (128). Une stimulation au GHRH de ces cellules est associée à une plus forte augmentation de la production d'AMPc comparativement aux cellules tumorales ne comportant pas cette modification. Il a donc été suggéré que des formes alternatives du GHRH-R puissent conférer une sensibilité accrue au GHRH (128).

Récemment, le clonage des GHRH-R bovin et ovin a été effectué par Horikawa et coll. (111). Le récepteur ovin a été cloné à partir d'une librairie d'ADNc d'hypophyses. Le récepteur contient 407 aa, soit 16 aa de moins que les GHRH-R identifiés dans d'autres espèces. Cette particularité provient de la terminaison prématurée de la traduction due à un codon stop à la place d'un résidu tryptophane en position 408. L'analyse de l'ADN génomique du GHRH-R de mouton démontre également la présence de cette délétion (111). Une deuxième isoforme du GHRH-R ovin est caractérisée par une insertion dans sa structure oligomérique de 90 nucléotides à une jonction exon-intron, dans la région du cinquième passage transmembranaire. Ce récepteur serait très sévèrement tronqué puisqu'un codon stop se trouverait dans la séquence insérée. Le clonage du GHRH-R bovin par une approche de RT-PCR a démontré la présence d'un récepteur de 423 aa sans délétion comparativement au récepteur ovin (114). Des études par photoaffinité du GHRH ont confirmé la taille inférieure du complexe GHRH-GHRH-R ovin (111). Il est à noter que cette différence au niveau de la taille moléculaire est préservée suite à la déglycosylation du récepteur. Des études de liaison ont démontré que la délétion observée dans le récepteur ovin n'affecte pas l'affinité de liaison du GHRH. Toutefois, la production d'AMPc stimulée par le

GHRH est amplifiée avec le GHRH-R ovin en comparaison au récepteur bovin ou humain suggérant que la délétion permette une potentialisation de l'effet. Des études avec le récepteur humain tronqué par mutagénèse dirigée au site de délétion du récepteur ovin renforcent l'hypothèse que la portion C-terminale inhibe la production d'AMPc possiblement par une régulation négative du récepteur (111). Comme la séquence délétée contient 6 sites potentiels de phosphorylation, elle pourrait être impliquée dans la régulation négative du récepteur soit par l'inhibition de l'interaction avec la protéine G, tel qu'observé avec le récepteur de la sécrétine (129), ou de son internalisation, tel qu'observé avec le récepteur de la calcitonine tronqué en C-terminal (130).

Finalement, deux isoformes, générées par épissage alternatif, ont été isolées d'hypophyses antérieures de porc (131). Les isoformes (G3R et G5R) sont identiques aux 418 premiers aa mais diffèrent de l'aa 419 à 423. De plus, l'isoforme G5R contient 28 aa supplémentaires à l'extrémité C-terminale. Lorsqu'exprimé de manière stable dans les cellules HEK 293, le GHRH lie l'isoforme G3R avec une affinité plus élevée que l'isoforme G5R. De plus, la concentration d'AMPc intracellulaire, stimulée par le GHRH, est plus élevée avec l'isoforme G3R (131). Ces résultats suggèrent que la modification de l'extrémité C-terminale puisse entraîner des changements d'affinité de liaison du GHRH à son récepteur et diminuer la fonctionnalité du GHRH-R.

1.2.3 Structure du gène du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

Le gène du GHRH-R humain a été identifié par hybridation *in situ* au niveau

du chromosome 7p14 (132) par Gaylinn et coll. et sur le chromosome 7p15 par l'équipe de Wajnrajch (133). L'analyse du gène a démontré la présence de plus de 10 exons répartis sur plus de 8 kb (134). Les résultats d'une autre équipe suggèrent que le gène comporte jusqu'à 13 exons distribués sur 12 kb (135). La taille des exons est d'environ 100 pb tandis que celle des introns varie entre 126 et 4708 pb. L'analyse du promoteur a démontré la présence de plusieurs sites de liaison de facteurs de transcription basaux tels que le facteur nucléaire NF-1 (nuclear factor-1), SP1 (stimulating protein-1), et USF (upstream regulatory factor) qui ont également été identifiés au niveau du promoteur de la GH (134). De plus, des sites de liaison de facteurs de transcription tissu-spécifiques tels que les facteurs à domaine POU, Pit-1 ou GHF-1 (growth hormone factor 1), qui sont spécifiques à l'hypophyse et le facteur de transcription brain-2 (Brn-2), spécifique aux neurones, ont été observés (134). Finalement la région promotrice de GHRH-R contient des sites de liaison de facteurs de transcription inductibles par des stimuli exogènes comme AP-1 (activator protein-1), CREB (cAMP-response element (CRE)-binding protein), ER (estrogen receptor) et NF-KappaB (facteur nucléaire-κB) (134). L'étude *in vitro* de l'activité du promoteur du récepteur a révélé un élément de réponse positif aux glucocorticoïdes situé dans la région -1456 à -1181 et un élément de réponse négatif aux estrogènes dans la région -202 à -108 (134).

Par RPA, il a été démontré que le gène contient un site majeur d'initiation de la transcription situé à 40 pb (134) ou 122 pb (136) en amont du site d'initiation de la traduction. Aucun élément potentiel d'initiation de la transcription telle qu'une boîte TATA ou CCAAT ou des séquences initiatrices n'ont été retrouvées dans la

région promotrice d'intérêt tel qu'observé chez plusieurs récepteurs couplés aux protéines G récemment caractérisées (134). Le promoteur du GHRH-R appartiendrait donc à la même famille que le promoteur de l'enzyme déoxynucléotidyl transférase terminale ayant comme caractéristique l'absence de boîte TATA, un faible contenu en GC et une régulation au cours du développement (134).

Chez le rat, le gène du GHRH-R contient 14 exons étalés sur 15kb. Un exon alternatif situé à l'exon XI a été identifié (120). La taille des exons varie de 42 à 456 pb et celle des introns de 111 pb à plus de 2 kb. À l'intérieur de la séquence promotrice de 1.9 kb, des sites de liaison ont été identifiés pour les facteurs de transcriptions GATA, CREB, Ets-1 (E26 transformation-specific-1), C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein) et Pit-1 pouvant être impliqués dans l'expression tissu-spécifique du GHRH-R (120). De plus, des sites de liaison pour les récepteurs nucléaires aux estrogènes et glucocorticoïdes ont été observés (120). Quatre sites d'initiation de la transcription situés à 286, 203, 93 et 84 pb en amont du site d'initiation de la traduction ont été identifiés. Aucun motif consensus de boîte TATA ou CAAT n'a été observé près des sites d'initiation de la transcription identifiés (120). Récemment, Nogami et coll. ont également isolé une séquence promotrice de 2925 kb contenant un seul site d'initiation de la transcription à 105 pb du site d'initiation de la traduction (137). La région -145 à -230 renfermait également un site de liaison de Pit-1, deux éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes et trois éléments de réponse aux glucocorticoïdes. À l'aide d'études de cotransfection transitoire et d'essai de mobilité électrophorétique

retardée (EMSA), il a été possible de déterminer qu'un des deux éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes et deux des trois éléments de réponse aux glucocorticoïdes étaient fonctionnels de même que le site de liaison à Pit-1 (137). La présence d'éléments de réponse fonctionnels dans cette région suggère que les sites d'initiation de la transcription, identifiés par Miller et coll., situé à -286 et -203 soient des sites secondaires puisqu'ils sont localisés dans des régions de régulation du promoteur (120, 137). Finalement, un élément de réponse fonctionnel à l'acide rétinoïque a été identifié dans la région -1090 à -1074 (137).

Le gène de GHRH-R de la souris a été localisé sur le chromosome 6 et sa structure est similaire à celui du rat (138). Il comporte 13 exons distribués sur plus de 10kb et contient également un exon alternatif situé entre l'exon X et XI (138).

1.2.4 Localisation du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

Dans l'hypophyse antérieure, l'expression du GHRH-R est restreinte aux cellules somatotropes. Une étude d'immunohistochimie ultrastructurale de Morel et coll. a démontré la présence du GHRH-R au niveau de la membrane cytoplasmique, des granules de sécrétion, de la matrice cytoplasmique, de la membrane nucléaire et de la matrice nucléaire des cellules somatotropes exclusivement dans l'hypophyse humaine et de rat (139). La plus haute densité de marquage a été retrouvée au niveau du cytoplasme principalement dans les granules de sécrétion de la GH et de la membrane cytoplasmique (139). Ces résultats indiquaient que l'action du GHRH au niveau de l'hypophyse antérieure est spécifique aux somatotropes (139). L'ARNm du récepteur a été colocalisé avec

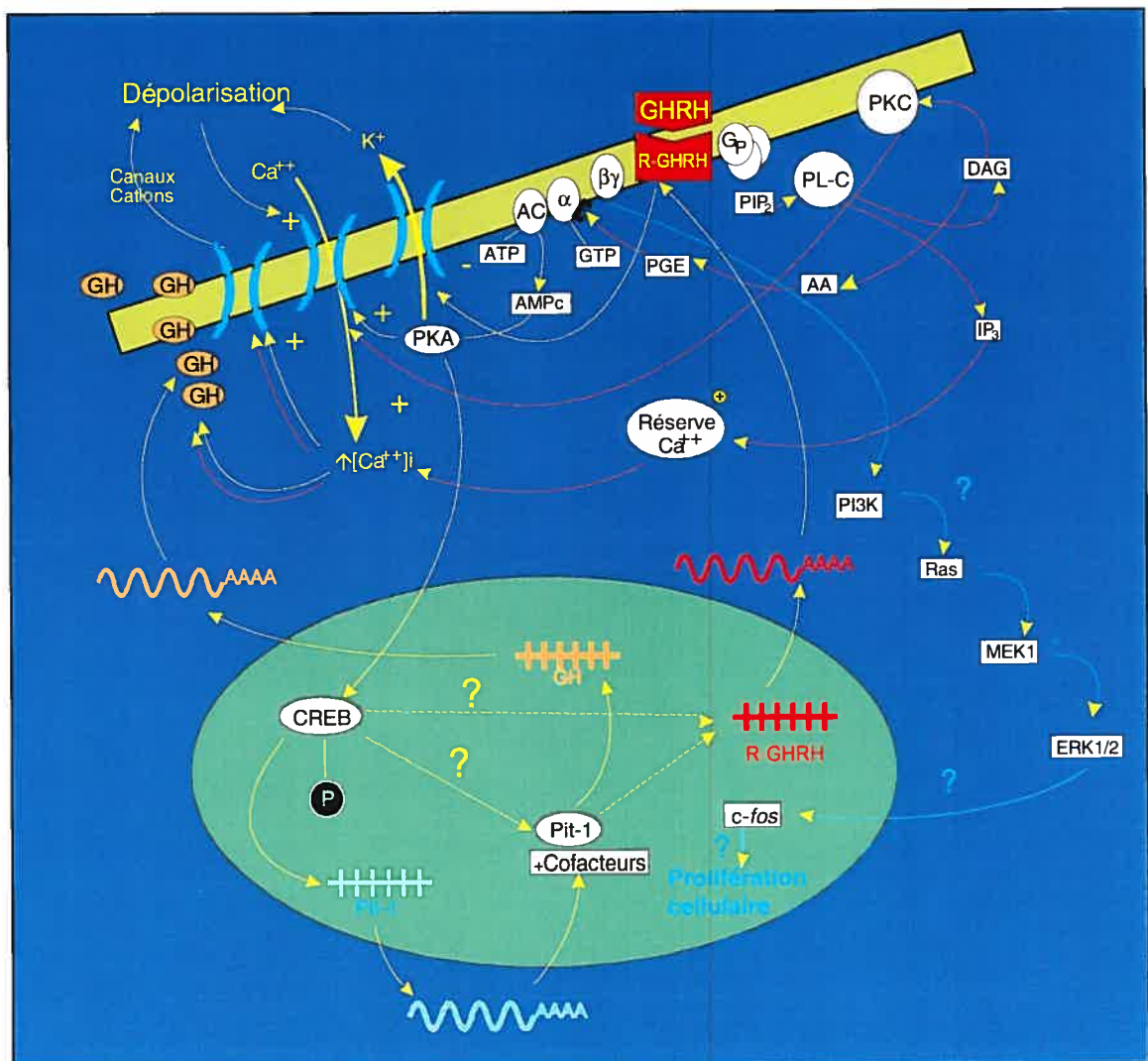
l'ARNm du facteur de transcription spécifique à l'hypophyse Pit-1 qui est restreint au lobe antérieur de l'hypophyse (107). Dans l'hypothalamus, une étude par RT-PCR a permis la localisation de l'ARNm du GHRH-R de rat dans les noyaux périventriculaire et ventromédial ainsi que dans l'aire hypothalamique antérieure. De plus, l'ARNm du GHRH-R de rat a été observé dans le noyau arqué de l'hypothalamus suggérant un rétrocontrôle par le GHRH (140). Par hybridation *in situ*, il a également été retrouvé en faible concentration dans le cortex cérébral (140). A l'aide de la technique d'amplification par RT-PCR, Matsubara et coll. ont démontré, chez le rat, la présence de l'ARNm du GHRH-R dans plusieurs tissus tels que le cœur, le poumon, la glande thyroïde, le duodénum, l'intestin grêle, la rate, la glande surrénalienne, le rein, l'épididyme, le muscle squelettique et son absence dans le foie, l'estomac et le tissu adipeux (96).

1.2.5 Voies de signalisation intracellulaire du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

La liaison du GHRH à son récepteur hypophysaire permet la synthèse et la sécrétion de la GH (Fig. 2). La cascade intracellulaire conduisant à cet événement débute par la stimulation d'une protéine G stimulatrice (G_s) activant une adénylyl cyclase ce qui résulte en une production d'AMPc. L'accumulation de ce second messager permet l'ouverture de canaux ioniques membranaires conduisant à une entrée de calcium extracellulaire. La stimulation par le GHRH active également, *via* l'AMPc, des canaux sodiques insensibles à la tétrodontoxine ou des canaux cationiques non-sélectifs conduisant à une dépolarisation et à l'activation de canaux calciques (141). Cette augmentation de calcium permet d'une part l'exocytose des granules de sécrétion de GH (142-144) et d'autre part l'activation

de la sous-unité catalytique de la protéine kinase A (PKA) dépendante de l'AMPc (145). L'un des substrats de cette enzyme est le facteur de transcription CREB qui stimule la transcription de gènes dépendants de l'AMPc (146) tel que le gène du facteur de transcription spécifique à l'hypophyse, Pit-1. Celui-ci permet la transcription du gène de la GH ainsi que celui du GHRH-R. L'augmentation intracellulaire de l'AMPc est également impliquée dans la prolifération cellulaire des somatotropes (63).

Figure 2 : Voies de signalisation intracellulaire dans les somatotropes en réponse au GHRH



La cascade intracellulaire impliquant la protéine kinase A est reconnue comme étant la principale voie de signalisation intracellulaire utilisée suite à l'activation du GHRH-R par le GHRH (147). Cependant d'autres voies telles que la voie de la protéine kinase C (PKC) et celle des "mitogen-activated protein kinase" (MAPK) pourraient également être impliquées lors de l'activation du GHRH-R (Fig. 2). Une stimulation par le GHRH de cellules d'hypophyse antérieure en culture primaire conduit à une mobilisation du calcium intracellulaire suggérant l'activation de la phospholipase C ou des canaux calciques (148). Il a été démontré que des activateurs des protéines kinases C tels que la télécidine et le 4 bêta-phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) augmentent, dans les cellules de l'hypophyse antérieure, la concentration d'AMPc basale et stimulée par le GHRH (149, 150), tandis que le l'acétate de tétradécanoylphorbol (TPA) et des analogues du diacylglycérol augmentent la sécrétion d'hormone de croissance de culture primaire de cellules d'hypophyse antérieure (151-153). Finalement, plusieurs récepteurs de la sous-famille B-III des récepteurs couplés aux protéines G, incluant les récepteurs du VIP et du PACAP, peuvent activer la phospholipase C (154, 155). Cependant, French et coll. n'ont observé aucune modification de l'activité de la protéine kinase C par le GHRH dans des somatotropes (156). De plus, le TPA n'altère pas l'activité du promoteur du GHRH-R (134). L'utilisation de la voie de signalisation intracellulaire impliquant la PKC, suite à l'activation du GHRH-R, demeure donc à être confirmée.

Il a été démontré que le GHRH peut directement activer la voie des MAP kinases dans les cellules hypophysaires. L'activation des MAP kinases par des

facteurs de croissance a été associée à la prolifération cellulaire. Cette voie a également été récemment associée à la différenciation cellulaire (157). Pombo et coll. ont démontré l'activation de la voie des MAP kinases par le GHRH dans des cellules hypophysaires et une lignée cellulaire surexprimant le GHRH-R humain (158) ainsi que l'implication de PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) et de p21^{ras}. Zeitler et coll. ont démontré que le traitement des cellules GH4 avec le GHRH induit la prolifération cellulaire et que cet effet est aboli par un pré-traitement des cellules avec l'inhibiteur de MEK1 (MAP/ERK Kinase I), le PD98095, suggérant l'implication de la voie des MAP kinases dans la prolifération cellulaire des somatotropes induite par le GHRH (159). Finalement, Lee et coll. ont démontré que l'expression du GHRH-R à l'aide d'un vecteur adénoviral dans la lignée cellulaire GH3, permet, suite à une stimulation au GHRH, d'augmenter les niveaux d'AMPC, la phosphorylation du facteur de transcription CREB et restaure la sécrétion de GH (160). De plus, une stimulation de ces cellules par le GHRH permet l'activation de la voie des MAP kinases, l'induction de *c-fos* et l'augmentation de la prolifération cellulaire (160).

1.2.6 Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

Des études de saturation avec le [His¹, I¹²⁵I-Tyr¹⁰, Nle²⁷]hGHRH(1-32)NH₂ effectuées dans des homogénats d'hypophyses de rat de 2 mois ont mis en évidence la présence de deux classes de site de liaison: un site à haute affinité et basse capacité et un site à plus faible affinité et haute capacité (161).

La taille du GHRH-R déduite de la séquence d'ADNc est de 47kDa chez le

rat (15). Des études de réticulation chimique ont permis d'observer des entités de 26 kDa (162), 27 et 42 kDa (163) ou 28, 47 et 65 kDa (164) dans l'hypophyse de rats. L'immunobuvardage Western de préparations membranaires d'homogénats d'hypophyse de rats a permis la détection de trois protéines de 44, 47 et 65 kDa (164). Il a été suggéré que l'entité de 47 kDa corresponde à la forme décrite par Mayo (107) tandis que les entités de 28 et 44 kDa pourraient représenter des formes tronquées de la protéine de 47 kDa ou des isoformes du GHRH-R. L'entité de 65 kDa représenterait une forme longue du GHRH-R ou une forme glycosylée puisque la structure renferme des sites potentiels de N-glycosylation (107, 108, 110). Chez l'humain, des protéines de 52 et 57 kDa ont été observées, par immunobuvardage Western, dans des préparations membranaires d'hypophyse antérieure tandis qu'une entité de 45 kDa a été détectée par réticulation chimique et immunobuvardage Western dans des cellules BHK transfectées avec le GHRH-R humain (164). Chez le bovin, des entités de 31 et 75 kDa GHRH-R ont été observées par réticulation chimique (165). Le développement d'analogues photoréactifs du hGHRH(1-32)NH₂ a mené à la détection de protéines de 55 et 57 kDa dans l'hypophyse ovine et bovine, respectivement (166). Ces entités ont une taille de 43 et 47 kDa lorsqu'elles sont déglycosylées, ce qui est en accord avec les prédictions basées sur la séquence oligonucléotidique (166).

De Almeida et Mayo ont étudié les régions du GHRH-R humain impliquées dans l'interaction avec le GHRH en exprimant des récepteurs tronqués et chimériques (167). Il a été démontré que des récepteurs dont l'extrémité N-terminale extracellulaire ou les sept segments transmembranaires avaient été tronqués sont déficients au niveau de la liaison du GHRH suggérant que l'extrémité

N-terminale extracellulaire ou les segments transmembranaires et leurs boucles extracellulaires seules ne suffisent pas à une liaison du GHRH à haute affinité. Des chimères entre le récepteur du GHRH et le récepteur du VIP ont permis d'identifier les régions responsables de la liaison spécifique avec le GHRH (167). Le récepteur chimérique renfermant le domaine N-terminal extracellulaire du VIP-R ou du récepteur de la sécrétine et le domaine C-terminal du GHRH-R lie le GHRH et stimule l'accumulation de l'AMPc suite à une stimulation au GHRH. La chimère inverse ne lie pas le GHRH et n'active pas l'adénylyl cyclase suite à une stimulation au GHRH. Ces résultats suggèrent que l'extrémité N-terminale extracellulaire en association avec les passages transmembranaires et leurs boucles extracellulaires soient essentiels à la liaison du ligand cependant les passages transmembranaires et leurs boucles extracellulaires sont responsables de la spécificité de l'interaction avec le ligand (167).

1.2.7 Régulation de l'expression du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

La régulation de l'expression du GHRH-R par son ligand a été suggérée suite à des études d'immunisation passive au GHRH induisant une réduction marquée des niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire chez les rats nouveau-nés (168) et de la réponse au GHRH *in vitro* (169). Cependant Miki et coll. ont démontré une augmentation des niveaux d'ARNm du GHRH-R suite à l'immunoneutralisation du GHRH endogène avec un antisérum spécifique (170). Des résultats similaires ont été rapportés par Bilezikjian et coll. où une réduction de 50% du nombre de sites de liaison au GHRH a été provoquée suite à une incubation *in vitro* de 2 h en présence de 0.5 nM de GHRH (171).

Dans des cultures primaires de cellules hypophysaires de rat, une diminution concentration-dépendante des niveaux d'ARNm du GHRH-R a été observée après un traitement de 4 h au GHRH (0.1 et 1 nM) (172). Des résultats similaires ont été obtenus en présence de forskolin, un activateur direct de l'adénylyl cyclase suggérant que le GHRH inhibe la synthèse de son récepteur en régulant à la baisse ses niveaux d'ARNm par un mécanisme impliquant l'AMPc (172). L'analyse d'un fragment de 1.4kb du promoteur du GHRH-R humain n'a démontré aucune régulation par la forskolin (134) ainsi qu'un fragment de 2.1 kb par le 8-Br-cAMP (173). Le fragment de 2 kb du promoteur du GHRH-R humain contient un élément CRE en position -253 cependant celui-ci ne semble pas fonctionnel (45). Un élément CRE a également été suggéré dans la région promotrice de GHRH-R de rat, sa fonctionnalité n'a cependant pas été démontrée (86). Des éléments CRE situés à l'extérieur de la région 5' étudiée ainsi qu'à l'intérieur d'intron pourraient expliquer la régulation de GHRH-R dépendante du GHRH et de l'AMPc.

Le phénomène de désensibilisation par le GHRH a été étudié chez des rats nouveau-nés, adultes (174) et âgés (119). L'immunoneutralisation du GHRH endogène réduit significativement les niveaux d'ARNm du GHRH-R chez les rats nouveau-nés, juvéniles et adultes. L'effet du GHRH sur la régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R dépend de la durée de stimulation des cellules de l'hypophyse en culture primaire (174). Suite à une incubation de 4, 12 et 24 h, les niveaux d'ARNm sont diminués, normalisés et augmentés chez les rats adultes et nouveau-nés (174). Cependant, l'augmentation de l'expression du récepteur est beaucoup plus élevée chez les rats nouveau-nés en comparaison aux rats adultes.

Ces résultats suggèrent donc que l'effet du GHRH sur l'expression du GHRH-R dépendrait de plusieurs facteurs tels que la durée d'exposition au GHRH ainsi que le stade de développement de l'hypophyse (174). Chez le rat de 2 mois, l'administration de 0.5 mg/kg de GHRH durant 14 j permet d'augmenter le nombre de sites de liaison comparé au témoin de 2 mois tandis que l'injection de 1 mg/kg diminue le nombre de sites de liaison en comparaison aux rats ayant reçu la plus faible concentration. Chez le rat âgé (18 mois), seule l'administration de 1 mg/kg permet de restaurer les paramètres de liaison du GHRH-R en comparaison à ceux observés chez des rats de 2 mois. Ces résultats suggèrent que la régulation de l'affinité du GHRH-R pour le GHRH varierait en fonction de l'âge (119).

Le phénomène de désensibilisation a été étudié dans des cellules BHK exprimant le GHRH-R humain et des cellules d'hypophyse de rat (175). Dans les deux types cellulaires, la désensibilisation du récepteur se produit rapidement (2-5 min) d'une façon homologue et concentration-dépendante. Cependant, contrairement aux cellules BHK, la stimulation des cellules hypophysaires en présence de forskolin et db-cAMP (dibutyryl-cyclicAMP) provoque la désensibilisation du récepteur et abolit une stimulation subséquente au GHRH, suggérant également une désensibilisation hétérologue (175). Ces résultats indiquent que la désensibilisation du GHRH-R peut se produire *via* différents mécanismes selon le type cellulaire et l'origine du récepteur.

L'expression du GHRH-R est également régulée par des hormones. Avant le clonage du GHRH-R, il avait été remarqué que dans les cellules hypophysaires dispersées de rats ayant subi une surrénalectomie, les sites de liaison du GHRH

étaient régulés à la baisse (176). Cependant, une thérapie de remplacement aux glucocorticoïdes permet de restaurer la capacité maximale de liaison du GHRH sans changement de l'affinité de liaison (176). Suite au clonage du GHRH-R, plusieurs équipes ont rapporté la stimulation de l'expression du gène du GHRH-R par les glucocorticoïdes *in vivo* (177-180). Une diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R a été remarquée chez des rats surrénalectomisés et leur augmentation suite à un traitement au corticostérone (179). Une augmentation des niveaux d'ARNm du GHRH-R a également été remarquée chez des rats traités à la dexaméthasone (177). De plus, les niveaux d'ARNm du GHRH-R sont élevés dans des cellules hypophysaires suite à un traitement *in vitro* aux glucocorticoïdes (179, 180). Le dexaméthasone n'augmente pas les niveaux d'ARNm du GHRH-R en présence d'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, démontrant ainsi l'effet des glucocorticoïdes sur la transcription du gène du GHRH-R (179). Au niveau du promoteur du GHRH-R de rat, deux éléments de réponse fonctionnels peuvent expliquer l'effet des glucocorticoïdes sur la régulation de l'expression du GHRH-R (137).

Les hormones thyroïdiennes étant essentielles à la croissance des mammifères, l'hypothyroïdisme est donc associé à une perturbation de la croissance linéaire, qui est normalisée par une thérapie de remplacement (45). Tam et coll. ont observé une réduction des niveaux hypophysaires du GHRH-R chez des rats souffrant d'hypothyroïdisme (181). Une thyroïdectomie diminue de 60% les niveaux d'ARNm du GHRH-R chez le rat, cette diminution est partiellement renversée par une thérapie de remplacement à la T₄ (182). Korytko et Cuttler ont démontré que l'incubation de cellules hypophysaires en culture

primaire en présence de T_3 conduit à une forte augmentation concentration-dépendante des niveaux d'ARNm du GHRH-R (178). *In vitro*, les hormones thyroïdiennes augmentent la sensibilité des somatotropes au GHRH (183). Après une hypothyroïdie de trois semaines, les niveaux de transcrits de 2.5 et 4 kb d'ARNm du GHRH-R diminuent de 1.7 fois chez le rat (181) et la concentration des complexes immunoréactifs de 65- et 47-kDa, de 1.3 et 3.5 fois, respectivement (164). Au niveau des paramètres de liaison, la capacité maximale des sites de liaison à haute et basse affinité diminue, de 4.6 et 15.2 fois, respectivement (164). L'analyse nucléotidique d'un fragment de 2kb du promoteur du GHRH-R humain n'a pu révéler la présence d'un élément de réponse aux hormones thyroïdiennes (134) suggérant que la régulation par ces hormones se produise en 5' de la région analysée. Cependant, chez le rat, Nogami (137) a observé que la région promotrice située entre -145 et -230 contient un élément de réponse fonctionnel aux hormones thyroïdiennes.

Nogami et coll. ont démontré l'action synergique des glucocorticoïdes avec les hormones thyroïdiennes et l'acide rétinoïque résultant en une augmentation des niveaux d'ARNm du GHRH-R (184). Cet effet est expliqué par l'augmentation de la transcription du gène du GHRH-R puisque des transfections transitoires de cellules MtT-S avec une portion de 3kb du promoteur du GHRH-R permettent de réguler l'expression d'un gène rapporteur en présence de ces hormones (137). Un élément de réponse fonctionnel à l'acide rétinoïque ayant été localisé entre les paires de base -1090 et -1074, l'effet synergique pourrait être expliqué par une hétérodimérisation des récepteurs aux glucocorticoïdes avec des récepteurs aux hormones thyroïdiennes ou de l'acide rétinoïque ce qui pourrait permettre une

modulation de leur activité (137). Par ailleurs, l'hétérodimérisation des récepteurs aux hormones thyroïdiennes et de l'acide rétinoïque a déjà été observée (185).

Un dimorphisme sexuel de l'expression du GHRH-R a été rapporté. Ono et coll. ont démontré que les niveaux d'ARNm du GHRH-R chez la femelle âgée de 3 mois ne représentaient que 15% de la valeur observée chez le rat mâle (186). Chez les rates LOU/C de 2 et 4 mois les niveaux de transcrits de 2.5 et 4 kb du GHRH-R sont de 2 à 3 fois plus faibles que chez le mâle (187). Par ailleurs, des niveaux similaires d'ARNm du GHRH-R ont été observés dans l'hypophyse de rats nouveau-nés et jeunes chez les deux sexes (188). Ces résultats contradictoires pourraient refléter les différents stades de développement des animaux étudiés. Il a été démontré que l'ovariectomie augmente de 2 à 3 fois les niveaux d'ARNm du GHRH-R chez la femelle. Cet effet est aboli en présence d'estrogène (177). L'estrogène diminue également les niveaux d'ARNm du GHRH-R chez le rat mâle castré (186). À l'aide d'un système d'expression transitoire, l'inhibition de l'activité du promoteur du hGHRH-R a été démontrée en présence de β -estradiol (134). L'analyse nucléotidique du promoteur humain a permis de localiser des éléments de réponse potentiels aux estrogènes, ceux-ci semblent être actifs puisque les estrogènes suppriment l'activité du promoteur du GHRH-R transfecté dans la lignée cellulaire hypophysaire GH4 (134).

La régulation de l'expression du GHRH-R au cours du développement chez le rat a été étudiée (189). Korytko et coll. ont observé par RPA que les niveaux d'ARNm du GHRH-R variaient en fonction de l'âge. En effet, les niveaux d'ARNm du GHRH-R les plus élevés sont observés au jour embryonnaire 19.5, ceux-ci

diminuent durant la période périnatale, pour augmenter à nouveau à l'âge de 30 j, ce qui correspond au stade de la maturation sexuelle, et diminuent subséquemment avec l'âge. Il a de plus été démontré que la régulation de l'ARNm de la GH ainsi que de Pit-1 varie avec l'âge mais ne parallèle pas celle de l'ARNm du GHRH-R (189).

Au cours du vieillissement, chez le rat de 12 mois, Deslauriers et coll. ont mis en évidence une diminution de la capacité de sécrétion de la GH des cellules somatotropes, suite à une stimulation *in vivo* et *in vitro* par le GHRH (190). Cependant le contenu hypophysaire en GH n'est pas altéré (190). Chez le rat de 20 mois, la sécrétion de GH stimulée par le GHRH est réduite de façon importante et le contenu hypophysaire en GH est diminué de 30% (190). Il a donc été suggéré que la diminution de la sécrétion de GH provienne d'une altération au niveau de la capacité à stimuler les cellules somatotropes puisque les mécanismes intracellulaires conduisant à la sécrétion de GH demeurent fonctionnels (191). D'une part, la diminution de la sécrétion de GH pourrait être due à une altération au niveau du GHRH. Parenti et coll (1987) ont observé une diminution de la sécrétion de GH stimulée par le GHRH et de l'activation de l'adénylyl cyclase avec le vieillissement (192). Des résultats similaires ont été obtenus par Qing et coll. suite à l'immunisation passive de rats mâles avec des doses supramaximales d'antisérum anti-GHRH (193). Ces équipes ont suggéré une diminution de la sécrétion de GHRH afin d'expliquer leurs résultats. D'autre part, les altérations observées au niveau de l'axe somatotrope pourrait être la conséquence de changements au niveau du GHRH-R. Les premières altérations du GHRH-R se produisent à 8 mois chez le rat alors qu'une diminution du nombre de sites de

liaison à haute affinité du GHRH est remarquée. À 14 mois, une augmentation transitoire du nombre de sites à basse affinité est observée suivie à 18 mois, d'une disparition du site à haute affinité et d'une diminution du nombre total de sites de liaison (194, 195). Les actions du GHRH sur la sécrétion de GH semblent impliquer préférentiellement les sites à haute affinité, car la diminution de leur capacité correspond à une diminution de la sécrétion de la GH survenant au cours du vieillissement (194). Comme l'altération des paramètres de liaison du GHRH débute à un âge auquel aucune perturbation de facteurs centraux et/ou périphériques impliqués dans la réponse des somatotropes n'a été rapportée, le changement des caractéristiques du GHRH-R pourrait représenter l'une des premières causes menant à la diminution de la production d'AMPC induite par le GHRH chez les rats âgés (194). Puisque les paramètres de liaison du récepteur de la SRIF ne sont pas altérés avec l'âge (196), les observations au niveau du GHRH-R ne seraient pas associées au vieillissement général de l'hypophyse antérieure. Au niveau de la protéine, les entités de 65 et 47 kDa ont diminué chez les rats âgés entre 8 et 18 mois, alors que l'entité de 44 kDa n'est pas affectée par le vieillissement (197). Les deux transcrits (4 et 2.5kb) du GHRH-R hypophysaire sont également régulés au cours du vieillissement. Entre 8 et 18 mois, les niveaux du transcrit de 4 kb augmentent significativement tandis qu'à 18 mois, les niveaux du 2.5kb sont diminués de 30% (197). Ces résultats suggèrent que la diminution de la réponse de la GH au GHRH observée lors du vieillissement puisse être en partie expliquée par les altérations du GHRH-R hypophysaire.

1.2.8 Rôle du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

L'étude de la souris *little* a permis de mieux définir le rôle du GHRH-R hypophysaire. Le gène du récepteur du GHRH chez cette souris comporte une mutation en position 60 où l'aa glycine est remplacée par un acide aspartique (15). La glycine en position 60 est conservée dans la structure du récepteur du rat, de souris et d'humain et de même que chez tous les membres de la sous-famille B-III des récepteurs couplés aux protéines G. L'acide aminé muté se trouvant dans la portion extracellulaire N-terminale impliqué dans la liaison du ligand, il a été démontré qu'il perdait sa capacité à lier son ligand et de médier une réponse intracellulaire (198). Chez la souris *little*, une hypoplasie de l'hypophyse antérieure a été remarquée, précisément au niveau des cellules somatotropes, ce qui suggère un rôle du GHRH-R dans la prolifération et la différenciation des cellules somatotropes en plus de son rôle dans la synthèse et la sécrétion de GH (138). Comme ce déficit en somatotrope n'est pas observé chez l'embryon, l'action du GHRH-R ne semble pas être nécessaire à l'initiation du développement de l'hypophyse antérieure. Il est donc proposé que les cellules somatotropes souches présentes dans la région antérolatérale se développent en absence du système GHRH-GHRH-R. Cependant, sans la présence du GHRH-R, elles seraient incapables de proliférer dans la partie caudomédiane et se différencier en cellules somatotropes matures (138).

Chez l'humain, trois mutations ont été identifiées chez des familles souffrant de nanisme du Pakistan, du Brésil et du Sri Lanka (173, 199, 200, 200, 201). L'une de ces mutations est localisé dans une portion hautement conservée de la

région extracellulaire du GHRH-R dans laquelle est également retrouvée la mutation chez la souris *little*. Cette mutation a été identifiée en position 72 où un acide glutamique est remplacé par un codon stop donnant lieu à une protéine tronquée sans domaine transmembranaire. Cette mutation provoque une sévère déficience en hormone de croissance et le nanisme (201), renforçant l'hypothèse d'un rôle du GHRH-R dans la prolifération et différenciation des somatotropes également chez l'humain.

1.3 Le rein comme tissu cible de la GH et de l'IGF-I

1.3.1 Physiologie du néphron

Le rein est constitué de trois parties principales: le cortex, la médulla et le bassinet. La filtration du sang est effectuée par les unités de filtration rénale appelées néphron. Chaque néphron est premièrement constitué d'un regroupement de capillaires artériels, le glomérule, localisé dans la partie corticale. Chaque glomérule est entouré d'une capsule glomérulaire dont l'épithélium est formé de fentes de filtrations permettant de recueillir ce qui a été filtré de l'endothélium fenestré des capillaires du glomérule (202).

Le filtrat glomérulaire est par la suite acheminé au tubule contourné proximal localisé dans le cortex. Le rôle du tubule contourné proximal est de réabsorber activement dans le sang presque tous les nutriments, 80% des ions sodiques et plusieurs autres ions tels que HCO_3^- , Cl^- , K^+ , Ca_2^+ et PO_4^{3-} . Le glucose

et les acides aminés sont entièrement réabsorbés dans cette partie du néphron. Les ions sodiques sont principalement réabsorbés à la membrane basolatérale par une pompe à sodium (Na^+K^+)-ATPase qui est responsable d'établir et de maintenir le gradient ionique à travers la membrane (203,204). Ce gradient permettra au HCO_3^- et au Cl^- d'être réabsorbés passivement. Le transport de l'eau est effectué par un canal à eau, l'aquaporine 1 (205). Ce canal est localisé au niveau de la membrane basolatérale et apicale assurant le transport transépithélial de l'eau (205, 206). Les cellules du tubule contourné proximal sécrètent dans le filtrat des substances telles que des ions ammoniacques et des déchets azotés. Elles sont aussi impliquées dans le maintien du pH sanguin et du liquide interstitiel en contrôlant la sécrétion de H^+ (207, 208). A sa sortie du tubule contourné proximal, le volume du filtrat a diminué de 80% (209).

Le filtrat est, par la suite, acheminé vers l'anse de Henlé qui se prolonge dans la médulla interne. L'anse de Henlé est composée d'une partie descendante perméable à l'eau et d'une partie ascendante perméable aux ions. La différence de perméabilité des deux portions de l'anse de Henlé aide à l'établissement d'un gradient osmotique dans le liquide interstitiel qui s'accroît du cortex vers la médulla (210). Dans la partie descendante, l'eau du filtrat est réabsorbée dans le liquide interstitiel. Celui-ci devient donc hypotonique et le filtrat est plus concentré en ions et autres solutés (210). Le transport de l'eau est assuré par le canal à eau, aquaporine 1 (211). La partie ascendante mince de l'anse de Henlé est perméable aux ions et imperméable à l'eau (212). Le chlore est réabsorbé par un canal au chlore, ClC-k1 . Cette protéine est localisée aux membranes apicale et basolatérale permettant le transport transépithélial du chlore (213). Le liquide

interstitiel a donc une forte osmolarité au niveau de la médulla interne et le filtrat se dilue lors du passage dans cette partie du néphron (209). Le filtrat sortant de la partie descendante étant très concentré, la partie ascendante utilisera cette forte concentration ionique pour maintenir l'osmolarité élevée du liquide interstitiel en réabsorbant passivement les ions du filtrat. Finalement, la médulla maintient son gradient osmotique car le sang des capillaires s'équilibre continuellement avec le liquide interstitiel.

La réabsorption du filtrat dans le reste du néphron est liée aux besoins ponctuels de l'organisme et régie par une régulation hormonale. Le filtrat entrera dans la partie ascendante épaisse de l'anse de Henlé qui est perméable aux ions et imperméable à l'eau. Vingt à 30% du sodium du filtrat sera absorbé dans ce segment du néphron (209). La partie épaisse de l'anse de Henlé est riche en pompe $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$ à la membrane basolatérale (203) tandis que la membrane apicale possède un cotransporteur $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$. La régulation du transport ionique dans cette partie du néphron est fortement influencée par la vasopressine (214). La libération de vasopressine est régulée par les osmorécepteurs de l'hypothalamus qui détectent la concentration de soluté dans le liquide extracellulaire (215). Plus spécifiquement, il a été observé que la vasopressine augmente la réabsorption de sodium *via* l'augmentation de l'expression du cotransporteur $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ (216). L'activité du transporteur $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$ pourrait être contrôlée par l'aldostérone, une hormone synthétisée par la corticosurrénale afin d'augmenter la réabsorption de sel (217). Une ablation des surrénales réduit l'activité du transporteur tandis qu'une thérapie de remplacement à l'aldostérone restore son activité (218). Le transport du chlore

à la membrane apicale serait assuré par des canaux à chlore et probablement par un transporteur KCl (219). Un canal à chlore, ClC-k2, a récemment été identifié dans la partie épaisse de l'anse de Henlé à la membrane basolatérale (220). Une modulation du transport du chlore, *via* l'AMPc, à la membrane basolatérale a été observée en présence de vasopressine (221). Le canal à chlore, ClC-k2, pourrait faire partie de cette régulation du transport du chlore par la vasopressine. L'absorption active du sodium dans cette partie du néphron représenterait une des étapes cruciales à l'établissement d'un gradient osmotique à l'intérieur de la médulla (222, 223), permettant ainsi à l'anse de Henlé descendante mince de réabsorber passivement l'eau.

La partie épaisse de l'anse de Henlé contient également les cellules de la macula densa. Ces cellules sont sensibles au ralentissement de l'écoulement du filtrat et aux changements osmotiques et, de par leur proximité avec les artérioles afférente et efférente de l'appareil juxtaglomérulaire, permettent la modulation de ces événements (224, 225). En effet, la rénine synthétisée par l'appareil juxtaglomérulaire sous l'action d'une faible pression artérielle convertira l'angiotensinogène hépatique en angiotensine I (226-228). Celle-ci est par la suite convertie en angiotensine II par des enzymes de conversion (229). L'angiotensine II constitue un puissant vasoconstricteur qui active les muscles lisses vasculaires de l'organisme entier afin d'élever la pression artérielle systémique et la filtration glomérulaire (209). Elle stimulera également la production d'aldostérone par la corticosurrénale afin d'augmenter la réabsorption active de sodium et passive de l'eau (230), conduisant à une augmentation de la pression systémique artérielle. Malgré que le rôle principal de la rénine soit de stabiliser la pression artérielle

systémique, elle sera libérée lors d'une diminution du volume sanguin ou une augmentation de l'osmolarité (231).

Au niveau de la partie contournée distale, la sécrétion et l'excrétion des ions sont sélectives selon la présence de mécanismes régulateurs tel que l'aldostérone et la vasopressine (232). La production d'aldostérone sera déclenchée par une diminution de la pression artérielle, une diminution de l'osmolarité du filtrat ou par la stimulation du système nerveux sympathique (232). Cette régulation par l'aldostérone serait associée à l'augmentation de l'expression du cotransporteur Na^+Cl^- (233, 234) qui est retrouvé à la membrane apicale et fait partie de la même famille que le transporteur $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ (235, 236). À la membrane basolatérale, la pompe $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{-ATPase}$ assure le transport du sodium vers le liquide interstitiel (237). La réabsorption de chlore est assurée par le transporteur chlore ClC-k2 à la membrane basolatérale (220, 238). La réabsorption de l'eau est sous le contrôle de la vasopressine. Le tubule contourné distal sécrète également des ions H^+ et ammonium (209).

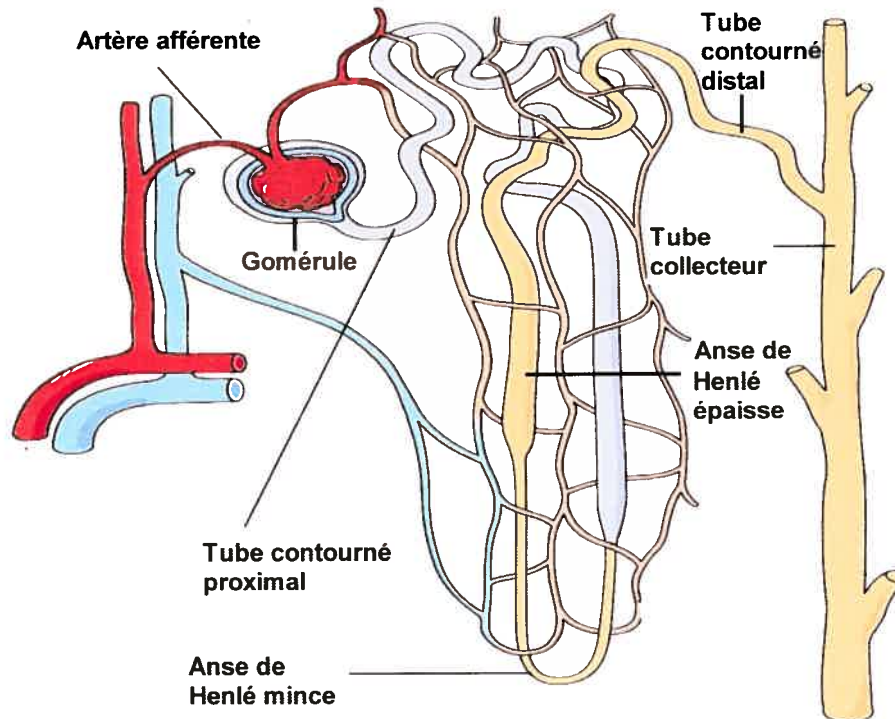
Finalement, le filtrat est acheminé dans le tube collecteur où les ions K^+ et HCO_3^- sont absorbés ou sécrétés, selon le pH sanguin (239). La réabsorption du sodium dépend de la pompe $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{-ATPase}$ à la membrane basolatérale et d'un canal à sodium (ENaC) à la membrane apicale (232) et serait régulée par l'aldostérone (240). En absence de vasopressine, le tube collecteur est presque imperméable à l'eau et le rein sécrète de l'urine diluée (232). Cependant en présence de vasopressine, le filtrat perd de l'eau par osmose due à la forte osmolarité du liquide interstitiel (232, 241), le rein sécrète donc une urine

concentrée. L'action de la vasopressine se fera *via* l'aquaporine 2. En effet, la liaison de la vasopressine à son récepteur permettra l'activation de la protéine kinase A qui phosphorylera l'aquaporine 2 permettant sa translocation à la membrane apicale. À long terme, l'expression du gène de l'aquaporine-2 sera également augmentée par l'action de la vasopressine (242). Les aquaporines 3 et 4, situées à la membrane basolatérale des cellules principales du tube collecteur, permettent à l'eau d'être transportée au niveau du liquide interstitiel (242). Au niveau de la médulla interne, la présence d'un transporteur d'urée permet le maintien d'une forte osmolarité médullaire et du gradient osmotique croissant dans le liquide interstitiel du cortex vers la médulla (243, 244). Un transporteur rénal d'urée, UT-A1, a été localisé au niveau du tube collecteur de la médulla interne et serait régulé par la vasopressine selon un mécanisme qui demeure encore inconnu (245). Cette forte osmolarité du liquide interstitiel au niveau de la médulla interne favorisera la concentration de l'urine lors de son passage dans le tube collecteur médullaire par la réabsorption passive de l'eau (246).

En plus de l'aldostérone et de la vasopressine, le facteur natriurétique auriculaire participent également à la régulation du transport ionique (247, 248). Le facteur natriurétique auriculaire, une hormone libérée par certaines cellules des oreillettes suite à une élévation de la pression sanguine, abaisse la pression artérielle et le volume sanguin en inhibant tous les phénomènes favorisant la vasoconstriction ainsi que la rétention d'ions et d'eau (247). La production d'aldostérone, de rénine et de vasopressine est donc inhibée en présence du facteur natriurétique auriculaire. Une diminution de la réabsorption d'eau et de sodium dans l'anse de Henlé épaisse, les tubules contournés distaux et le tube

collecteur se produit donc, favorisant la diminution de la pression sanguine (241).

Figure 3 : Schéma de l'appareil néphrologique chez le rat



Expression du GH-R et de l'IGF-I/IGF-I-R dans le néphron de rat:

- **Glomérule:** ARNm IGF-I-R, IGF-I-R
- **Tube contourné proximal:** ARNm GH-R, IGF-I
- **Anse de Henlé mince:** IGF-I
- **Anse de Henlé épaisse:** ARNm GH-R, ARNm IGF-I, IGF-I,
ARNm IGF-I-R, IGF-I-R
- **Tube contourné distal:** IGF-I, ARNm IGF-I-R
- **Tube collecteur:** ARNm IGF-I, IGF-I,
ARNm IGF-I-R, IGF-I-R

1.3.2 L'axe GH-IGF-I rénal

1.3.2.1 Localisation du récepteur de la GH, de l'IGF-I et de son récepteur dans le rein

Chez le rat, le récepteur de la GH (GH-R) est localisé dans le tubule proximal (249) (Fig. 2). Comme le récepteur de l'IGF-I (IGF-I-R) ne semble pas être exprimé dans ce segment du néphron, la GH pourrait y agir directement. En effet, Rogers et coll. ont démontré que la GH stimule la gluconéogenèse dans les tubules proximaux canins sans augmentation d'IGF-I (250).

L'IGF-I a été détecté dans le tubule proximal plus particulièrement lors de lésions aiguës suggérant que l'IGF-I provienne des nouvelles cellules épithéliales non-différenciées et des macrophages qui participent au processus de réparation tissulaire (251).

La présence de l'IGF-I dans la partie mince de l'anse de Henlé a été démontrée par immunocytochimie (252) (Fig.2). La partie épaisse de l'anse de Henlé exprime l'IGF-I, l'IGF-I-R et le GH-R. Il s'agit du seul segment du néphron où ces trois entités sont colocalisées suggérant que la GH puisse agir *via* la synthèse d'IGF-I, permettant une action autocrine ou paracrine (249). L'IGF-I est également observé dans le tube contourné distal (253)

Au niveau du tube collecteur médullaire, plusieurs équipes ont observé des résultats contradictoires concernant la présence de l'ARNm de l'IGF-I ou de sa protéine (254, 255, 255, 256) (Fig. 2). L'IGF-I a été détecté dans cette partie du

néphron et pourrait être d'origine plasmatique ou filtrée puisque son ARNm n'a pas été détecté (257). Cependant, Andersson et coll. ont démontré par immunohistochimie que l'IGF-I est distribué dans le cytoplasme des cellules du tube collecteur suggérant une synthèse locale de cette protéine (258). De plus, il a été démontré que la GH y augmente l'expression d'IGF-I (256).

Le récepteur de l'IGF-I a été localisé dans plusieurs parties du néphron suggérant de multiples sites d'action de l'IGF-I dans le rein (253) (Fig. 2). Le glomérule représente le site où l'IGF-I-R est le plus abondant. De plus, l'IGF-I-R est localisé dans le tubule proximal, l'anse de Henlé épaisse, le tube collecteur cortical et médullaire et l'ARNm de ce récepteur est également retrouvé dans le tubule distal (249, 255, 256). Au niveau du tubule proximal, l'IGF-I-R est localisé à la membrane basolatérale et apicale. Cependant des études fonctionnelles dans des tubules proximaux isolés perfusés de lapin ont démontré que le transport du phosphate stimulé par l'IGF-1 était plus important à la membrane apicale (259). La localisation du récepteur au niveau des deux membranes suggère l'action de l'IGF-I circulant et l'IGF-1 du filtrat.

Chez l'humain, Chin et coll. n'ont pu mettre en évidence par hybridation *in situ* l'ARNm de l'IGF-I dans le néphron (260, 261) contrairement à Bell et coll. (262) ainsi qu'à Hammerman et Miller en utilisant une approche de RPA (263). L'ARNm de l'IGF-I-R a été localisé dans le glomérule, le tubule proximal, le tubule distal ainsi que le tube collecteur cortical et médullaire (253).

1.3.2.2 Rôles potentiels de la GH et de l'IGF-I dans le rein

1.3.2.2.1 Réabsorption de phosphate

Corvilain et coll. ont démontré qu'un traitement à la GH augmente l'absorption tubulaire du phosphate chez des sujets normaux (264). De plus, des patients atteints de nanisme de Laron (mutation de récepteur de la GH) ont un niveau sérique réduit de phosphate dû à sa perte au niveau rénal (265). Finalement, le traitement de rats avec un antagoniste du GHRH diminue l'activité de la GH, les niveaux sériques d'IGF-I ainsi que la réabsorption rénale de phosphate (266). Cet effet pourrait être médié par l'IGF-I puisque la co-incubation d'IGF-I et d'un anticorps anti-IGF-I-R bloque l'augmentation du transport de phosphate (267). De plus le transport transcellulaire du phosphate de la membrane apicale à la membrane basolatérale dans les tubules proximaux de souris est augmenté suite à l'exposition à l'IGF-I du côté apical (267). *In vivo*, l'IGF-I n'est pas libéré par les tubules proximaux suggérant que l'effet de l'IGF-I au niveau de la réabsorption de phosphate dépende d'un mécanisme endocrinien et non d'une action paracrine ou autocrine (268).

1.3.2.2.2 Croissance compensatoire

L'effet de la GH et de l'IGF-1 circulant sur l'augmentation de la masse rénale a été documenté. L'administration de hIGF-I recombinante provoque la croissance de certains organes notamment du rein (269). Des patients atteints d'acromégalie ont une masse rénale plus élevée que des sujets normaux, celle-ci est réduite par la diminution de la sécrétion de GH suivant un traitement à la SRIF (270) tandis qu'une déficience en GH cause une réduction de la masse rénale (271). Un degré similaire de croissance rénale peut être observé chez des rats

déficients en GH suite à l'administration de GH ou d'IGF-I, suggérant que l'IGF-I puisse mimer les effets de la GH au niveau rénal (272). Des souris, surexprimant la GH dû à l'expression d'un transgène de la GH bovine, ont une augmentation de la taille des reins et plus spécifiquement des glomérules (273). Les souris surexprimant l'IGF-I ont également une croissance rénale et plus particulièrement des néphrons (274). L'augmentation de la masse rénale par la GH pourrait impliquer la stimulation de la synthèse d'IGF-I rénal. En effet, l'administration de GH augmente les niveaux d'ARNm de l'IGF-I hépatique et rénal mais n'affecte pas les niveaux d'ARNm de l'IGF-I-R rénal (249). Chez le rat, une hypophysectomie diminue les niveaux d'ARNm tubulaire de l'IGF-I et l'administration de GH renverse cet effet (249).

1.3.2.2.3 Néphrectomie unilatérale

Plusieurs équipes ont étudié la régulation de l'expression de l'IGF-I suite à une néphrectomie unilatérale (NU), les résultats obtenus sont toutefois discordants. Fagin et Melmed ont observé chez le rat que les niveaux d'ARNm de l'IGF-I rénal et de sa protéine augmentent suite à une NU et que ce phénomène précède une hypertrophie rénale (275). De plus, les niveaux sériques d'IGF-I demeurent inchangés (276). Cette augmentation (5 à 6 fois durant le premier 24h) n'est présente que durant les 7 premiers jours suivant l'intervention malgré la persistance d'une hypertrophie durant plusieurs mois (275). Une augmentation de l'IGF-I rénal 24 h suivant l'intervention et une normalisation après 4 j (277) ainsi qu'une élévation au cinquième jour post-opératoire se maintenant jusqu'au 33^{ième} jour (278) ont également été rapportées. Finalement, une augmentation des niveaux d'IGF-I dans les tubes collecteurs médullaires 4-15 j post-néphrectomie a

été mise en évidence (252, 279). L'effet de l'IGF-I sur la croissance compensatoire du rein, suivant une NU, pourrait résulter d'un effet indirect de la GH. Une étude de la sécrétion pulsatile de la GH a montré une augmentation de la libération de GH, 24 h suivant la NU qui est associée à une augmentation de la masse rénale. Celle-ci est plus faible 48 h post-NU et concorde avec le profil des pics de sécrétion de GH (280). De plus, l'administration d'antagonistes du GHRH diminue à la fois la sécrétion de GH et la croissance compensatoire du rein (276). Il a été démontré qu'une hypophysectomie diminue également la croissance rénale suivant une NU (281, 282). Chez les rats hypophysectomisés, le pourcentage d'augmentation du contenu rénal en IGF-I est similaire à celui des animaux témoins cependant la croissance rénale n'est pas aussi importante. Ainsi, l'IGF-I pourrait jouer un rôle important dans la croissance rénale compensatoire, indépendamment de la présence de GH (283). Flyvbjerg et coll. ont démontré que les niveaux d'IGF-I sériques diminuent suite à une NU et que l'administration d'un analogue de la SRIF prévient la croissance compensatoire rénale et l'augmentation de l'IGF-I rénale (284). Ces résultats suggèrent que la GH serait impliquée dans la régulation de l'IGF-1 rénal et dans la croissance rénale rapide suivant une néphrectomie.

1.3.2.2.4 Diabète

Une hypertrophie rénale est également retrouvée chez les rats diabétiques de type I suite à l'administration de streptozotocine. L'ARNm du GH-R rénal augmente chez le rat diabétique (285). Cette augmentation semble être tissu-spécifique puisque l'ARNm du GH-R diminue dans le cœur et le foie suite à l'induction du diabète (285) et suggère que le GH-R rénal puisse jouer un rôle dans

l'hypertrophie rénale (285). Les niveaux d'ARNm du GH-R rénal 7 j post-induction du diabète sont similaires à ceux des animaux témoins indiquant un rôle du GH-R à un stade précoce de la croissance rénale (286).

Suite à l'injection de streptozotocine, une augmentation des niveaux d'IGF-I rénaux (77%) a été observée. Elle précède l'hypertrophie rénale et disparaît au quatrième jour post-induction du diabète (277, 287). Flyvbjerg et coll. ont observé une augmentation de l'IGF-I rénal chez les rats ayant reçu de la streptozotocine sans traitement à l'insuline (288). Cette augmentation est observée à 24 h, devenant maximale à 48 h. La croissance rénale est significative après 4 j et est donc précédée par l'augmentation d'IGF-I. Les niveaux d'IGF-I sont normalisés après 4 j malgré la continuation de la croissance rénale bien qu'elle soit moins importante. Un traitement à l'insuline prévient la croissance rénale ainsi que l'élévation des niveaux d'IGF-I rénaux (288). Ces auteurs concluent que l'IGF-I serait important pour la croissance rénale initiale mais ne serait pas impliqué dans le maintien de l'hypertrophie rénale provoquée par le diabète de type I. L'augmentation de l'IGF-I rénal a également été observée chez des souris non-obèses spontanément diabétiques (289). Comme les niveaux d'ARNm de l'IGF-I demeurent inchangés (288), il a été proposé que l'augmentation de l'IGF-I rénal puisse être attribuée à une régulation traductionnelle, une séquestration rénale de l'IGF-I ou une diminution de la dégradation de ce peptide. Bach et coll. ont observé une augmentation des niveaux d'IGF-I et de ceux de son ARNm (290). Cette augmentation d'ARNm a également été observée par Catanese et coll (291). Phillip et coll. ont montré une augmentation d'IGF-I associée à une diminution d'ARNm, suggérant que l'accumulation d'IGF-I rénal résulte d'un changement des

paramètres de liaison à son récepteur plutôt que d'une augmentation de sa synthèse (292). L'étude des paramètres de liaison de l'IGF-I effectuée chez les rats diabétiques n'a pas permis une conclusion définitive. En effet, le pourcentage de liaison spécifique de l'IGF-I à son récepteur est augmentée de 2.5 fois dans le tissu rénal de rats diabétiques (293) alors que Marshall et coll. ont observé une diminution transitoire du pourcentage de liaison spécifique de l'IGF-I à des préparations membranaires rénales la première journée suivant l'induction du diabète (294). Bach et coll. ont observé une augmentation de la liaison de l'IGF-I à des préparations membranaires rénales durant les trois premiers jours du diabète expérimental (290).

La régulation de l'IGF-I chez le rat diabétique semble être tissu-spécifique. Contrairement au rein, les niveaux d'ARNm de l'IGF-I hépatique sont diminués chez le rat diabétique mais augmentent suite à un traitement à l'insuline. Les niveaux d'ARNm de l'IGF-I du poumon ne sont pas altérés dans ces conditions (291).

Des études utilisant des rats nains diabétiques ont permis de mettre en évidence l'implication de l'IGF-I et de la GH circulante dans les changements rénaux. Cette lignée de rats nains présente une déficience en GH observée par un contenu hypophysaire de 5 à 10% en comparaison à la normale ainsi que des concentrations réduites d'IGF-I circulante et tissulaire (295). Les rats nains diabétiques présentent une hypertrophie rénale plus lente et moins importante que celle des rats diabétiques témoins, indiquant que la GH serait impliquée lors de ce processus (296, 297). L'administration de GH à des rats nains diabétiques

renverse partiellement l'hypertrophie rénale mais n'a pas d'effet sur les niveaux d'IGF-I circulants ou rénaux (296). Il semblerait donc que les changements rénaux chez les rats diabétiques soient médiés par la GH et l'IGF-I et que certains effets de la GH soient indépendants de ceux de l'IGF-I (296).

Le traitement de rats diabétiques avec l'octréotide, un analogue de la SRIF, inhibe l'expression rénale d'IGF-I et prévient l'hypertrophie rénale (284, 298). En effet, l'octréotide inhibe l'augmentation d'IGF-I circulant et rénal chez le rat hypophysectomisé suite à une stimulation avec la GH recombinante (299). L'administration d'antagonistes de la GH à des rats diabétiques a également permis d'observer la présence d'un effet protecteur au niveau rénal puisque les reins présentent une hypertrophie rénale moins importante comparativement aux rats témoins (300)

La présence du diabète et d'une néphrectomie unilatérale chez le rat exerce un effet additif sur la croissance rénale et de l'IGF-I rénal en comparaison aux deux états individuels, suggérant l'implication de mécanismes différents (301).

1.3.2.2.5 Régénération tubulaire

Andersson et Jennische ont proposé que l'IGF-I puisse jouer un rôle dans la régénération des tubules proximaux suivant une ischémie aiguë (251). En effet, l'IGF-I n'est pas présent dans le segment S3 des tubules proximaux dans des conditions normales. Toutefois chez le rat, 3 j post-ischémie, des cellules tubulaires exprimant l'IGF-I sont observées dans la région endommagée (251). Cinq et 7 j post-ischémie, certaines cellules expriment l'IGF-I contrairement à

d'autres (251). Finalement, 14 j post-ischémie, la région S3 présente une morphologie normale et l'IGF-I est indétectable (251). Ainsi, une expression transitoire d'IGF-I surviendrait dans les étapes précoces de la régénération post-ischémie dans le tubule proximal (251).

1.4 Le récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance

1.4.1 Localisation du récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance

Tel que mentionné précédemment Matsubara et coll ont détecté chez le rat l'ARNm du GHRH-R par RT-PCR dans les trois principales parties du rein: le cortex, la médulla et le bassinnet. Toutefois, il n'a pu y être détecté sans amplification que dans la médulla (96). Le séquençage du produit de PCR a révélé 100% d'identité de séquence oligonucléotidique avec l'ADNc du GHRH-R hypophysaire de rat. Finalement, l'analyse de l'ARN en buvardage Northern a révélé que la taille du transcrit était similaire à celle du transcrit de 4kb du GHRH-R hypophysaire de rat (96). Une protéine de 52 kDa a également été observée chez l'humain, dans un homogénat de reins, à l'aide d'un anticorps anti-hGHRH-R (302).

1.4.2 Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance

Des essais de liaison en utilisant le $[^{125}\text{I-Tyr}(10)]\text{hGHRH}(1-44)\text{NH}_2$ comme radioligand ont permis de caractériser le site de liaison du GHRH-R rénal chez des rats de 2 mois (303). Une seule classe de sites de liaison a été observée dont l'affinité de liaison (K_d) et la concentration apparente (B_{max}) étaient de 27.8 ± 12.4 nM et de 30.1 ± 7.7 fmol/mg de protéine, respectivement. La liaison était saturable, réversible et a démontré une sélectivité pour des analogues du GHRH (303). Dans l'hypophyse antérieure deux classes de sites de liaison sont observées cependant les essais de liaison dans le rein ont été effectués à 4°C en raison de la forte activité protéolytique ce qui pourrait expliquer la présence d'une seule classe de site de liaison (185). Un phénomène comparable a été observé dans les cellules de la granulosa dans l'ovaire de rat où le GHRH montre une affinité modérée à 4°C pour son récepteur (90, 303). Le profil de structure-affinité de différents analogues dans la médulla rénale est différent de celui de l'hypophyse antérieure. Les peptides $\text{N}^\square\text{-Ac[D-Arg}^2, \text{Ala}^{15}]\text{rGHRH}(1-29)\text{NH}_2$, $\text{rGHRH}(1-29)\text{NH}_2$ et $\text{rGHRH}(3-29)\text{NH}_2$ présentent l'affinité la plus importante tandis que les analogues $\text{hGHRH}(1-29)\text{NH}_2$, $[\text{Ala}^{15}]\text{rGHRH}(1-29)\text{NH}_2$, $\text{hGHRH}(1-44)\text{NH}_2$ et $[\text{D-Val}^{13}]\text{hGHRH}(1-29)\text{NH}_2$ présentent une affinité modérée. Finalement les analogues $\text{rGHRH}(1-21)\text{NH}_2$ et $[\text{des}^{13-15}]\text{hGHRH}(1-29)\text{NH}_2$ ont une faible affinité (303). Les aa en position 1 et 2 ne semblent pas requis pour une haute affinité de liaison dans le rein tandis que leur délétion diminue drastiquement l'affinité de liaison et l'activité biologique du GHRH dans l'hypophyse (303). La modification de la portion centrale et C-terminale du GHRH-R apparaît être moins délétère dans la médulla rénale que dans l'hypophyse. Des études de réticulation chimique ont permis de détecter des complexes GHRH-GHRH-R de 65, 55 et 38 kDa dans ce tissu (303). L'ensemble de ces résultats suggère que le transcrite du GHRH-R rénal est similaire à celui de

l'hypophyse cependant la protéine semble être différente du GHRH-R hypophysaire, ce qui pourrait être expliqué par une traduction ou un processus de modifications post-traductionnel tissu-spécifique (303).

1.5 Justification de l'étude

En 1995, Matsubara et coll. ont étudié la distribution tissulaire de l'ARNm du GHRH et du GHRH-R chez le rat. Par buvardage Northern, seul l'ARNm du GHRH-R d'hypophyse et de médulla rénale sont détectables. Fujinaka et coll. ont par ailleurs étudié la distribution tissulaire du GHRH-R (302). Dans les tissus humains, le GHRH-R n'a été détecté que dans des homogénats d'hypophyse et de rein. Ces résultats sont concordants avec l'abondance des niveaux d'ARNm du GHRH-R chez le rat. Boulanger et coll. ont par ailleurs effectué la caractérisation du site de liaison au GHRH dans la médulla rénale de rat. Ils ont démontré que le GHRH-R rénal avait la capacité de lier le GHRH, et que cette liaison était spécifique, saturable et réversible (303). Le profil d'affinité de divers analogues du GHRH est cependant différent des résultats obtenus dans l'hypophyse antérieure. Ils ont également observé par des études de réticulation chimique, une hétérogénéité entre les poids moléculaires apparents des complexes obtenus dans l'hypophyse et la médulla rénale. Les résultats de ces différentes études ont permis de déterminer que le rein représente le seul tissu extrahypophysaire renfermant des concentrations élevées de GHRH-R. De plus, la capacité du GHRH-R à lier son ligand suggère la présence d'un récepteur fonctionnel. Finalement, comme plusieurs composantes de l'axe somatotrope, telles que le GH-R, l'IGF-I et son récepteur, sont synthétisées dans le néphron, il est suggéré

qu'une interaction potentielle existe entre le système GHRH et GH/IGF-I tel qu'observé au niveau de l'axe somatotrope. Cependant, l'absence de données concernant sa caractérisation, l'identification de sa localisation et sa régulation ne permettait pas de déterminer l'importance et le rôle du GHRH-R dans le rein.

L'un des objectifs de l'article "Localization and regulation of a functional growth hormone-releasing hormone receptor in the rat renal medulla" publié dans la revue «Endocrinology» du mois d'avril 2002 était de préciser la localisation de l'ARNm du GHRH-R dans le rein afin de fournir des informations préliminaires sur son rôle. Un essai de RPA a été mis au point dans la médulla rénale afin d'étudier cette question. Cette technique a donc permis de définir plus précisément la localisation de l'ARNm du GHRH-R dans la médulla rénale suivant l'isolation des deux types cellulaires principaux de la médulla, les cellules de l'anse de Henlé et du tube collecteur. Subséquemment, la régulation de l'ARNm du GHRH-R rénal au cours du développement et du vieillissement et selon un dimorphisme sexuel a pu être étudié, car il est connu que ces états physiologiques régulent l'expression de l'ARNm du GHRH-R dans l'hypophyse antérieure. Cet objectif permettait d'une part, de comparer les résultats obtenus dans le rein et l'hypophyse afin de déterminer les similitudes/différences inter-tissus et d'autre part, de fournir des pistes concernant le rôle du GHRH-R rénal. Afin de déterminer le rôle du GHRH-R dans le rein, la fonctionnalité du récepteur devait premièrement être vérifiée. Deux approches différentes ont été utilisées, soit l'internalisation du GHRH-R et la régulation négative de son expression, suite à une stimulation au GHRH, en utilisant des cellules semi-purifiées d'anse de Henlé. Afin d'atteindre ce dernier objectif, un protocole de culture cellulaire d'anses de Henlé semi-purifiés stimulés

au GHRH a été mis au point. Les niveaux d'ARNm du GHRH-R ont par la suite été analysés par RPA. Le protocole d'internalisation a également dû être mis au point dans les cellules semi-purifiées d'anse de Henlé.

Les résultats obtenus dans le premier article concernant le rôle du GHRH-R dans la médulla rénale permettait de formuler deux hypothèses soit un rôle dans le transport hydrique et/ou ionique compte tenu de sa localisation dans l'anse de Henlé, soit une implication dans la prolifération cellulaire tel qu'observé dans l'hypophyse antérieure. Le deuxième article intitulé "Localization of the rat growth hormone-releasing hormone receptor in the loop of Henle and its tissue-specific regulation by high dietary salt intake and water deprivation" (soumis à *Endocrinology*) s'est intéressé au rôle du GHRH-R au niveau du transport ionique et hydrique. Le premier article avait permis de localiser l'ARNm du GHRH-R dans l'anse de Henlé. Dans ce deuxième article, la localisation des concentrations les plus élevées de l'ARNm du GHRH-R a été démontrée dans l'anse de Henlé mince. Cet objectif a été complété par la localisation spécifique du GHRH-R au niveau de la partie mince ascendante de l'anse de Henlé, en utilisant une approche de co-localisation immunocytochimique, à l'aide de marqueurs spécifiques de la portion descendante et ascendante des cellules d'anse de Henlé purifiées. Puisque le segment descendant de l'anse de Henlé est impliqué dans l'équilibre hydrique et le segment ascendant joue un rôle dans l'homéostasie ionique, il s'avérait important d'étudier la régulation *in vivo* de l'expression de l'ARNm du GHRH-R lors de la modulation de ces fonctions rénales. Pour atteindre cet objectif, les niveaux d'ARNm du GHRH-R médullaire ont été quantifiés chez des rats soumis à une diète riche en sel ou à une restriction hydrique. L'effet de ces traitements a été

comparé avec celui obtenu pour le GHRH-R hypophysaire.

L'objectif de l'article intitulé "Tissue-specific regulation of pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor mRNA levels in the streptozotocin-diabetic rat" (soumis à *Endocrinology*) était de vérifier la deuxième hypothèse émise concernant un rôle du GHRH-R dans la prolifération cellulaire tel qu'observé dans l'hypophyse antérieure. Afin d'atteindre cet objectif, la régulation de l'expression de l'ARNm du GHRH-R lors d'une pathologie où un effet prolifératif au niveau rénal a été documenté, tel que le diabète, a été étudiée. Un diabète de type I a donc été induit chez des rats par injection de streptozotocine et la régulation de l'expression du GHRH-R rénal a été étudiée au cours du développement de la maladie dans la médulla rénale en comparaison avec l'hypophyse antérieure.

2.0 MANUSCRITS

Localization and regulation of a functional growth hormone-releasing hormone receptor in the rat renal medulla

Chantale Boisvert*, Caroline Paré*, Christelle Veyrat-Durebex, Alma Robert, Sophie Dubuisson, Gérard Morel and Pierrette Gaudreau

Laboratory of Neuroendocrinology of aging, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Center, Notre-Dame Hospital and Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H2L 4M1; and Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5578, Université Claude Bernard Lyon-I (GM), Villeurbanne 69622, France.

Correspondence and request for reprints should be addressed to:

Dr Pierrette Gaudreau, Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Center, Notre-Dame Hospital, Rm M-5226, 1560 east Sherbrooke street, Montreal, Quebec, Canada, H2L 4M1.

Tel: (514) 890-8000 extension 27159

Fax: (514) 412-7661

e-mail [REDACTED]

Running title: Localization and regulation of GHRH receptor in kidney

*C Boisvert and C Paré contributed equally to this work.

Key words: growth hormone-releasing hormone, receptor, renal medulla, loop of Henle, development, aging, mRNA level, immunocytochemistry, internalization, fluorescent ligand

Titre de l'article: Localization and regulation of a functional GHRH receptor in the rat renal medulla. *Endocrinology*. 2002. 143(4):1475-84.

Auteurs: Boisvert C, Paré C, Veyrat-Durebex C, Robert A, Dubuisson S, Morel G, Gaudreau P.

Participation: Les travaux décrits dans ce manuscrit ont été effectués par Chantale Boisvert en collaboration étroite avec Caroline Paré. Les expériences comportant de nombreux échantillons (RPA) ou des manipulations complexes (isolation des cellules du tube collecteur et de l'anse de Henlé, durée: environ 20h), ont requis deux personnes pour mener à bien le projet. Les études de détection par hybridation *in situ* et immunologique du GHRH-R ont été effectuées par Chantale Boisvert. Les expériences de régulation de l'expression du GHRH-R rénal par le GHRH ont été réalisées par Caroline Paré tandis que les expériences d'internalisation du GHRH-R ont été effectuées par Christelle Veyrat-Durebex et Sophie Dubuisson. Alma Robert, assistante de recherche au laboratoire de neuroendocrinologie du vieillissement, a aidé à la mise au point de l'essai de RPA dans le rein. L'article a été rédigé par Chantale Boisvert. Pierrette Gaudreau a supervisé les étapes de réalisation de l'étude et de rédaction de l'article.


Chantale Boisvert


Caroline Paré


Christelle Veyrat-Durebex


Alma Robert


Sophie Dubuisson


Gérard Morel


Pierrette Gaudreau

ACCORD DES COAUTEURS

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

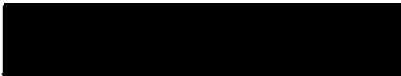
Chantale Boisvert
BCM, Biochimie

2. Description de l'article

Boisvert C, Pare C, Veyrat-Durebex C, Robert A, Dubuisson S, Morel G, Gaudreau P. Localization and regulation of a functional GHRH receptor in the rat renal medulla. *Endocrinology*. 2002. 143(4):1475-84.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

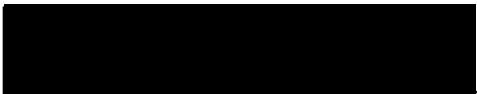
À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Chantale Boisvert** inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Localisation, régulation et fonction du récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat"


27/01/03

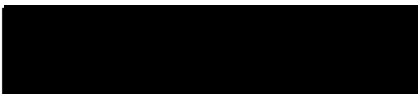
 Coauteur Signature Date


27/01/03


 Coauteur Signature Date


27/01/03


 Coauteur Signature Date


27-01-03

 Coauteur Signature Date


27/01/03

 Coauteur Signature Date


27/01/03

 Coauteur Signature Date

ABSTRACT

To provide information about the kidney growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R), we assessed its tissue and cellular localization, defined its pattern of expression in developing and aging rats and studied effects of GHRH on the regulation of GHRH-R mRNA levels and receptor internalization. *In situ* hybridization and ribonuclease protection assay demonstrated that GHRH-R mRNA is restricted to the Henle's loop (HL). GHRH-R mRNA levels were low in the medulla from 3- and 12-day-old male rats, increased significantly in that from 30- to 70-day-old rats and decreased in that from 12- and 18-month-old animals. When compared to the GHRH-R mRNA profile obtained in the pituitary, these data support the concept of a tissue-specific regulation of GHRH-R. In HL cell cultures from 70-day-old rats, a 4-h incubation with 1-100 nM rGHRH(1-29)NH₂ reduced GHRH-R mRNA levels significantly. As anti-GHRH-R (392-404) immunoreactivity was demonstrated in HL cells, internalization of Fluo-GHRH in a time- and temperature-dependent manner, and inhibition of this process by phenyl arsine oxide, indicates that desensitization to GHRH involves both GHRH-R internalization and down-regulation of GHRH-R mRNA levels. Localization of a functional GHRH-R in HL and its regulation during development and aging suggest roles associated to cellular proliferation, differentiation and/or water/electrolyte transport.

INTRODUCTION

Growth hormone (GH) plays a crucial role in promoting growth and development in young mammals and maintaining tissue integrity and functionality in adults. GH is also an important regulator of protein, lipid and carbohydrate metabolism. Its effects result either from a direct action on target tissues or are mediated by insulin-like growth factor-I (IGF-I) (1). In the anterior pituitary, GH pulsatile release is under the dual control of two hypothalamic peptides, growth hormone-releasing hormone (GHRH) and somatostatin (SRIF) (2). Activation of specific GHRH and SRIF plasma membrane receptors on somatotroph cells (3, 4) leads to the stimulation or inhibition of cAMP production (5) and regulation of GH secretion and synthesis (6-8). GHRH is also involved in somatotroph proliferation and differentiation (9-13).

The GHRH receptor (GHRH-R) has been cloned in rat (3, 14), mouse (14), porcine (15), bovine (16), ovine (16) and human pituitary (3, 17, 18) and in human pituitary adenomas (17-19). It belongs to the secretin-glucagon-vasoactive intestinal peptide subfamily of G-protein-coupled receptors (3). In mouse and rat pituitaries, the presence of 2-2.5-kb and 3.1-4-kb GHRH-R mRNA transcripts has been reported (3, 14). While the 2-2.5-kb transcript likely generates the 423 amino acid (aa) functional GHRH-R (20), the structure and role of the 4-kb transcript is currently unknown. In human pituitary adenomas, 2-, 2.8- and 4.5-kb transcripts were identified (18). The higher molecular weight transcripts encode C-terminal-modified forms of the GHRH-R (17, 18) that may interfere with the functional GHRH-R to decrease GHRH-induced cAMP signaling (21). In rat pituitary, GHRH-R variants, with either a longer third intracytoplasmic loop than the 423 aa receptor

(3) or a modified C-terminus (22), retain a similar affinity to GHRH but may exhibit a different ability to mediate GHRH-induced cAMP production. GHRH-R mRNA levels are subjected to a number of changes in the pituitary of developing (23) and aging (24) rats. Moreover, GHRH, glucocorticoids, sex steroids and thyroid hormones participate to a complex regulation of GHRH-R levels [for review see (25)].

Low concentrations of GHRH and GHRH-R mRNA have been detected, by reverse transcription (RT)-PCR, in the rat brain, heart, lung, duodenum, small intestine, spleen, kidney, epididymis and skeletal muscle but not in the liver (26). Interestingly, the kidney represents the sole extrapituitary tissue containing a sufficient concentration of GHRH-R mRNA to allow its detection without amplification (26). As no data exist, either on its precise localization in this organ, on the regulation of its expression or on its functionality, the specific aims of the present study were: 1) to localize the GHRH-R mRNA at the tissue and cellular level, 2) to define the pattern of GHRH-R mRNA expression in the developing and aging rat kidney, in order to compare with that of the anterior pituitary, and 3) to investigate the effect of an *in vitro* stimulation to GHRH on the regulation of GHRH-R mRNA levels and GHRH-R internalization.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animal and tissue preparations

Three-, 12-, 30-, 45-, 70-day-old male, 30-, 45-, 70-day-old female (Charles River Canada, St-Constant, Canada) and 2-, 12-, 18-, 22-month-old male Sprague Dawley rats (obtained from our aging rat colony, bought at 2 months of age from Charles River Canada) were used. They were kept in temperature- (22 C), humidity- (65%) and lighting- (12 h cycles; lights on at 0700 h) controlled rooms and had free access to food and water. After 3-4 days of acclimatization to the animal facilities, they were sacrificed in a block-design fashion, between 0900-1200 h by rapid decapitation. Pituitaries, kidneys and livers were excised immediately and anterior pituitary, renal cortex, medulla and pelvis dissected out. All tissues were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 C until RNA extraction. For *in situ* hybridization, tissues from 2-month-old male rats were fixed 2 h in 4% paraformaldehyde/100 mM mono-di-phosphate-buffered saline (300 mM NaCl) (PBS) before freezing in liquid nitrogen. For isolation of collecting duct (CD) and HL cells, medullas were washed and minced in ice-cold *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethane sulfonic acid (HEPES)-Ringer buffer (118 mM NaCl, 16 mM H-HEPES, 16 mM Na-HEPES, 14 mM glucose, 3.2 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.8 mM MgSO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 290 mosm, pH 7.4) (27). For primary culture of semi-purified HL cells, kidney excision and renal medulla dissection and mincing were performed aseptically, using HEPES-Ringer containing 250 U/ml penicillin/250 µg/ml streptomycin (Life Technologies, Burlington, Canada) and 1.25 µg/ml amphotericin B (Wisent Canada Laboratory, St-Bruno, Canada). The animal

protocol was approved by the Animal Care Committee of our institution in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Isolation of medullary CD and HL cells

Cell dispersion was performed using twelve 70-day-old male rats, according to a published protocol with some modifications (27). Minced medullas were incubated at 37 C in HEPES-Ringer collecting buffer, containing 0.2% (wt/vol) collagenase II (Life Technologies) and 0.2% hyaluronidase (ICN Pharmaceuticals, Montreal, Canada) for 75 min. After 30 min, 0.001% DNase (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Canada) was added to dissociate cell aggregates. Cells were also mechanically dispersed every 30-min by gentle pipetting with a 5-ml plastic pipet. Microscopic evaluation of the final suspension, using a Neubauer chamber, showed a majority of single cells and few aggregates (≤ 20 cells). The cell suspension was centrifuged at 28 X g for 2 min (16 C) and the pellet resuspended in 15 ml of HEPES-Ringer collecting buffer. This step was repeated twice for enrichment of CD cells in the pellet. The two first supernatants were kept for purification of thin limb HL cells. The pellet was resuspended in 1-2 ml HEPES-Ringer buffer and CD cells were purified by affinity chromatography using *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA)-coated magnetic beads (28). Tosyl-activated beads (4×10^8 beads/ml; Dynal, Lake Success, NY) were prepared by incubation with 0.1 mM avidin DX (Vector Laboratories, Burlingame, Canada) in 150 mM NaCl, 50 mM NaHCO₃, pH 8.5, at 37C for 16 h. After washing in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.1 mM Na₂HPO₄, 1.8 KH₂PO₄), beads were incubated with 0.05 mM biotinylated DBA in 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4, at 37C for 2 h. Unbound biotinylated DBA was removed by additional washing. CD cells

were incubated with DBA-coated beads (bead: cell ratio, 20:1) at 37°C for 10 min with gentle agitation, pelleted in a magnetic field and resuspended in HEPES-Ringer buffer. Elution of bound cells was performed by agitation with 300 mM N-acetyl-D-galactosamine (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, Canada), at room temperature (RT) for 2 h. Cells were pelleted (1000 X g, 4 C, 5 min) and washed twice with HEPES-Ringer buffer.

The HL cell suspension (two first supernatants) was centrifuged at 150 X g for 10 min (16 C) and washed twice in HEPES-Ringer buffer. This pellet was resuspended in 2 ml HEPES-Ringer buffer and treated with DBA-coated beads to isolate the residual MCD cells ($\leq 20\%$ in our experimental conditions). Unbound material was used to purify thin limb HL cells by differential centrifugation, using a continuous gradient of Nycodenz. The gradient was prepared by solubilizing 28% (wt/vol) Nycodenz [5-(N-2, 3-dihydroxypropylacetamido)-2,4,6-tri-iodo-N, N'-bis (2,3-dihydroxypropyl)-isophthalamide (Life Technologies) in 5 mM Tris.HCl buffer, containing 0.3 mM CaNa₂-EDTA and 3 mM KCl, pH 7.4. Twenty and 8% solutions of Nycodenz were prepared by appropriate dilutions with 7.45% (wt/vol) sucrose solubilized in the Tris.HCl buffer. The gradient was obtained according to the protocol of Grupp *et al.* (27). Thin limb HL cells were recovered in fraction I of the gradient after centrifugation at 1500 X g (16 C, 45 min) and washed twice in HEPES-Ringer buffer (430 X g, 16 C, 10 min).

Immunological characterization of medullary CD and HL cells

Equivalent amount of CD and HL cells ($\approx 2 \times 10^5$) were spun on each glass slide by cytocentrifugation (32 X g, RT, 2 min; Cytospin 3 centrifuge (Shandon,

Pittsburg, PA)) and fixed in acetone-methanol (50:50, -20 C, 15 min) and ethanol (70%, RT, 1 min), respectively. They were incubated in a 5% (wt/vol) bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich Canada)-PBS blocking solution (RT, 30 min). CD cells were labeled using fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled DBA (1:1000 diluted in PBS, RT, 10 min; Sigma-Aldrich Canada), thin limb HL cells, using a rabbit polyclonal anti-aquaporin-1 antibody (1:200 diluted in PBS, 37 C, 60 min; Alamone Labs, Jerusalem, Israel) and interstitial/vascular cells, using a mouse monoclonal anti-vimentin antibody (1:10 diluted in PBS, 37 C, 60 min; Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Canada). Slide-mounted cells were washed three times with PBS and HL and interstitial/vascular cells were visualized with a fluorescein-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:5000 diluted in PBS, RT, 60 min; Molecular Probes, Eugene, OR) and a Texas Red-X-conjugated goat anti-mouse antibody (1:10,000 diluted in PBS, RT, 60 min; Molecular Probes), respectively. Specificity of labeling was assessed by substituting primary antibodies with normal IgGs. All procedures with fluorescent probes were performed in the dark. Cells were visualized using a Nikon Eclipse TE600 (X20 objective), equipped with a coolsnap camera, a Nikon super high-pressure mercury lamp and a filter for excitation/emission of fluorescein (485/520 nm) and Texas Red (595/660) (Nikon Canada, Montreal, Canada).

Primary culture of semi-purified HL cells

Medullas from 70-day-old male rats were enzymatically and mechanically dissociated in HEPES-Ringer containing antibiotics, as described above. Dispersed cells were centrifuged at 28 X g (2 min, 4 C) and the pellet resuspended in HEPES-Ringer buffer containing antibiotics and recentrifuged. The two

supernatants were pooled and centrifuged at 150 X g (10 min, 4 C). The pellet was washed three times with DMEM/F-12 (Life Technologies), containing 250 U/ml penicillin/250 µg/ml streptomycin and 1.25 µg/ml amphotericin B and once with the culture media containing 50 U/ml penicillin/50 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin B. At this step, $\approx 40 \times 10^6$ cells was recovered from each medulla with a viability consistently between 95-98%, as assessed by trypan blue exclusion. After being cultured in 100 mm ID petri-dishes overnight at 37 C, in a humidified atmosphere, containing 95% air and 5% CO₂, cells were collected and rinsed twice with serum-free culture medium, containing 0.1% BSA and were preincubated 1h at 37 C in this medium. Cells were subsequently exposed 4 h to 1, 10 and 100 nM rGHRH (1-29)NH₂ (synthesized in our laboratory (29)) or the rGHRH vehicle (culture medium). At the end of the incubation period, cells were collected on ice, centrifuged (3000 X g, 10 min, 4 C) and washed in serum-free medium. Total RNA was extracted and analyzed by ribonuclease protection assay (RPA).

Northern blot hybridization

Total RNA was isolated from anterior pituitary, renal medulla and liver from 2-month-old male rats using a single step acid guanidinium-phenol/chloroform method with TRIzol (Life Technologies). Pituitary and medullary polyadenylated (poly A) RNA was isolated by chromatography using oligo (dT) cellulose (Ambion, Austin, TX). Northern blot hybridization was performed as previously described with minor modification (24). Aliquots of 1.5 µg poly A RNA were denatured by heating (65 C, 10 min) in a 50% formamide/17.5% formaldehyde/15 mM MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) solution and subjected to electrophoresis on

1.2% agarose/ 17.5% formaldehyde gels, using 33 mM MOPS buffer, pH 7.0, containing 5 mM sodium acetate and 1 mM EDTA (pH 8.0). RNA was transferred by capillary elution to a nylon membrane (GeneScreen, NEN Research Products, Boston, MA) and covalently attached by UV cross-linking and heating (80 C, 2h). Blots were hybridized with the RPR64 probe corresponding to the 3'-end of the rat GHRH-R complementary DNA (cDNA) (nucleotide position: 1044-1611) (3). The probe was labeled with [³²P]deoxy-CTP (3000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech), using random hexamer primers and the Klenow fragment of E.coli DNA polymerase (Life Technologies), and purified by chromatography using a G-50 column (Amersham Pharmacia Biotech). Hybridization was performed at 42 C during 16 h, in 50% formamide, 5X standard saline citrate (SSC) (1X SSC: 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0), 10% dextran sulfate, 1X Denhart's solution (50X : 1% BSA, 1% Ficoll 400, 1% polyvinylpyrrolidone), 20 mM Tris (pH 7.5), 0.1% SDS and 100 µg/mL DNA salmon sperm. Membranes were subsequently washed in 2X SSC/0.1% SDS, RT; 1X SSC/0.1% SDS, 65 C; 0.5X SSC/0.1% SDS; 65 C, 30 min each time) and exposed to XAR-5 films (Eastman Kodak, Rochester, NY) at -80 C, for 7 days with an intensifying screen. Membranes were stripped in a boiling aqueous solution of 0.1% SDS and rehybridized with a 1.2 kb rat glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) cDNA to assess the amount of RNA present in each lane. Quantification of each GHRH-R mRNA transcripts was performed using an IS1000 Digital imaging system (Alpha Innotech Corp/Canberra Packard, Québec, Canada). Specificity of the [³²P]RPR64 probe was assessed in each experiment using 5 µg liver total RNA. Linearity of protected signals was verified routinely, using 0.5-5 µg poly A RNA.

Ribonuclease protection assay

Renal medullas and anterior pituitaries from 70-day-old or younger male or female rats and cortex and pelvis from 70-day-old male rats were pooled to maximize RNA yields. Total RNA from these tissues and from semi-purified HL cells was isolated with TRIzol. The antisense [³²P]-labeled RPR64 riboprobe was generated by in vitro transcription of BamH I-linearized RPR64-pGEM3z plasmid, using T7 RNA polymerase (MAXIscript transcription kit, Ambion, Austin TX), in the presence of α -[³²P]UTP (800 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech). GAPDH mRNA levels were assessed, using a probe derived from exons 5-8 of the rat GAPDH cDNA (nucleotide position: 369-685). The antisense-labeled probe was generated by in vitro transcription of the Xba I-linearized p-TRI-GAPDH plasmid (Ambion), using T7 RNA polymerase. The specific activity of the [³²P]RPR64 riboprobe, determined after trichloroacetic acid precipitation onto GF/B Whatman filters (Fisher Scientific Ltd, Montreal, Canada), was $275\text{-}325 \times 10^6$ cpm/ μg RNA and the percentage of α -[³²P]UTP incorporation was 67-75%. RPA was performed according to published protocols with some modifications (23, 30, 31), using the RPA II kit (Ambion). Twenty μg total RNA from renal cortex, medulla and pelvis, 5 μg total RNA from anterior pituitary or semi-purified HL cells and 5 or 20 μg total RNA from liver (pituitary or kidney studies, respectively) were hybridized overnight at 50 C with the 4×10^6 cpm/ml [³²P]riboprobe. To normalize GHRH-R mRNA levels for experimental variations, 40 pg of the RPR64 Msc I cRNA standard (corresponding to nucleotide position of RPR64 cDNA: 1044-1203) was added to RNA samples before hybridization. A second step of normalization, with GAPDH

as internal standard, was used in semi-purified HL cell preparations to maintain the intra-assay coefficient of variation to $\leq 10\%$. Nonannealed nucleic acids were digested with RNase A (1 U/ml) and RNase T (40 U/ml) at 37 C for 30 min. Stable hybrids were resolved on 1.5 mm 5% polyacrylamide-8 M urea denaturing gels. Autoradiography was performed at -80 C using XAR-5 or Biomax Ms-1 films (Kodak) with intensifying screen. Tissue GHRH-R, GAPDH mRNA and cRNA standard levels were quantified by densitometry, using a IS1000 Digital imaging system. The intra-assay coefficient of variation of normalized GHRH-R mRNA levels was $\leq 10\%$ in all experiments. Specificity of the [³²P]RPR64 riboprobe was assessed in each experiment using 5 μ g pituitary total RNA and 5 or 20 μ g liver total RNA. Linearity of protected signals was verified routinely, using 10-30 μ g medulla total RNA or 1-10 μ g anterior pituitary or semi-purified HL cell total RNA. Results were expressed in percentage of relative density to a control group (70-day- or 2-month-old rats) or condition (purified cell populations, incubation with rGHRH vehicle), using a fixed amount of total RNA. Results were also expressed as GHRH-R mRNA relative densities per anterior pituitary or renal medulla total RNA content.

In situ hybridization

In situ hybridization was performed according to published protocols with some modifications (3, 32). Ten μ m cryosections of kidney, liver and pituitary were incubated in 20 mM Tris-2 mM CaCl₂ buffer with 1 μ g/ml proteinase K (Roche Diagnostics, Meylan, France) for 15 min at 37 C and post-fixed 5 min in 4% paraformaldehyde and 1 min in 100 mM triethanolamine (pH 8.0)- 0.25%

anhydrous acetic acid. Slides were dehydrated using ethanol series and air-dried. GHRH-R mRNA was detected using the RPR64 riboprobe. Antisense and sense [³⁵S]-labeled RPR64 riboprobes was generated by *in vitro* transcription as described above using T7 and SP6 RNA polymerase (MAXIscript transcription kit, Ambion), respectively, in the presence of α-[³⁵S]UTP (1000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech). Riboprobes were purified on 5% denaturing polyacrylamide gel and eluted in 0.5 M ammonium acetate, 1 nM EDTA and 0.2% SDS. Slide-mounted tissue sections were incubated in hybridization buffer containing 50% deionized formamide, 10% dextran sulfate, 4X SSC, 2X Denhardt's solution, 100 µg/ml yeast transfer RNA, 10 mM dithiothreitol, 100 µg/ml DNA salmon sperm and [³⁵S]GHRH-R riboprobe (≈6X10⁶ cpm/ml of hybridization buffer). *In situ* hybridization was performed overnight at 55 C. Sections were washed sequentially in 2X SSC for 1 h at room temperature, 2X SSC for 1 h at 60 C, and 1X SSC at room temperature. Sections were then treated with RNase A (100 µg/ml) for 45 min at 37 C and washed in 0.5X SSC for 1 h and 0.1X SSC for 45 min each at room temperature and dehydrated in ethanol. Slides were dipped in NTB2 nuclear emulsion (Kodak), exposed at 4 C for 5-15 days, developed in D19 (Kodak) and stained with 1% toluidine blue. Slides were examined using fluorescence light microscopy by epipolarization (Olympus Provis, Rungis, France). Specificity of the reaction was assessed in the kidney by hybridization with the sense [³⁵S]GHRH-R riboprobe and tissue specificity was assessed in the pituitary (positive control) and liver (negative control) with the antisens [³⁵S]riboprobe.

Immunocytochemical localization of GHRH-R

Semi-purified HL cells ($\approx 2 \times 10^5$) were spun on each glass slide by cytocentrifugation (32 X g, RT, 2 min) and fixed in 4% paraformaldehyde-phosphate-buffered saline (20 min, RT), washed twice in PBS (2 x 10 min) and permeabilized in 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Canada) (15 min, RT). Slides were then washed in PBS (4 x 5 min, RT), blocked with 5% BSA/PBS (30 min, RT), washed in PBS (3 x 5 min) and incubated with 0.5 μ g of the purified anti-GHRH-R(392-404) polyclonal antibody (33) in 100 μ l PBS, containing 1% BSA, overnight at 4 C, in a humid atmosphere. Cells were rinsed in PBS (2 x 10 min), incubated 1h, RT, in the presence of AlexaTM-conjugated goat anti-rabbit IgGs (Molecular Probe) (1:15000 in PBS-BSA buffer) and washed in PBS (2 x 10 min). All steps in presence of the fluorescent secondary antibody were performed in the dark. Slides were kept in a humid atmosphere for fluorescence microscopy examination. Analysis was performed using a Nikon Eclipse TE600 microscope (X20 objective).

Internalization of [N^{α} -5-carboxyfluoresceinyl-D-Ala², Ala⁸, Ala¹⁵, Lys²²]hGHRH(1-29)NH₂ (Fluo-GHRH)

Fluo-GHRH was synthesized by solid-phase methodology (34). Phenyl arsine oxide (PAO, Sigma-Aldrich Canada) was solubilized in 50% dimethyl sulfoxide (DMSO)/50% picopure H₂O to a final volume of 0.1% DMSO at 10 μ M PAO. Semi-purified HL cells were incubated at 4 C for 45 min in presence of 1 nM Fluo-GHRH to study temperature-dependency and kinetic of internalization. After centrifugation (2000 X g, 5 min, 4 C), supernatant was removed and cells washed once in cold HEPES-Ringer buffer. Cells were then either suspended in cold buffer

and spun ($\approx 2 \times 10^5$) on glass slides by cyto centrifugation (32 X g, RT, 2 min) for immediate visualization or warmed up at 37 C for 30, 60, 90 and 120 min, to allow internalization. Inhibition of internalization at 37 C was performed by preincubating cells 10 min with 10 μ M PAO prior to addition of Fluo-GHRH and including PAO during the 45-min incubation at 4 C and the 90-min incubation at 37 C. The effect of 0.1% DMSO alone was tested on the internalization of Fluo-GHRH. Non specific binding was determined in presence of 1 μ M rGHRH(1-29)NH₂. Reaction was stopped by placing tubes on ice and cyto centrifugation. Slides were kept on ice for immediate fluorescence microscopy examination. Analysis was performed using a Nikon Eclipse TE600 microscope (X20 objective).

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM. Comparisons of GHRH-R mRNA levels among groups or conditions were performed by ANOVA, followed by Tukey's or Dunnett's multiple range tests or by the Student's t test. Statistical significance of differences was established at $P < 0.05$.

RESULTS

Analysis of renal medulla GHRH-R mRNA transcripts

As shown in Fig. 1 by Northern blotting, two GHRH-R poly A mRNA transcripts of 3.7 and 2.3 kb (doublets) were detected in the renal medulla as in the anterior pituitary, using the RPR64 riboprobe. Total relative level of mRNA transcripts was 1.6 times lower in the medulla compared to that in the pituitary; the relative intensity of 3.7 and 2.3 kb transcript being 1.3 and 2.3 lower than that in pituitary, respectively. Similar results were obtained using RPR13, a riboprobe corresponding to nucleotide position 265-1134 of the rat GHRH-R cDNA (data not shown). No signal was detected in the liver with these probes (data not shown).

[Position of Fig. 1]

Localization of GHRH-R mRNA in the kidney by in situ hybridization

High density of labeling was restricted to HL cells of the renal medulla (Fig. 2A, B), while a low to very low intensity of labeling was observed in CD (Fig. 2B) and cortex (Fig. 2C) with the antisense RPR64 riboprobe or in the renal medulla when tissue sections were hybridized with the sense riboprobe (Fig. 2D). In these hybridization conditions, positive and negative signals were obtained in pituitary and liver tissue-sections, respectively (data not shown).

[Position of Fig. 2]

Quantification of protected GHRH-R mRNA fragments in RPA

Densitometric analysis of GHRH-R mRNA protected fragments from renal medulla, semi-purified HL cells and anterior pituitary showed a linear relationship with the amount of RNA loaded, in the range of 1-30 μg total RNA for renal tissue and in the range of 1-10 μg total RNA for pituitary (data not shown). Mean $R^2 \pm \text{SEM}$ was 0.97 ± 0.01 . Routinely, 20 μg of medulla, cortex or pelvis and 5 μg of semi-purified HL cells or pituitary total RNA were used. As previously reported, two distinct bands were detected using the RPR64 probe (23). The sum of both signals was considered as total density of GHRH-R mRNA. It was 2-3 times lower in the medulla than in the pituitary (data not shown). In the kidney of 70-day-old male rats (Fig. 3), the medulla contained highest GHRH-R mRNA levels. Signals were 13 and 7 times lower in the cortex and pelvis than in the medulla, respectively ($P < 0.01$). Similar results were obtained in the kidney from 45-day-old rats with signals 24 and 5 times lower in the cortex and pelvis than in the medulla, respectively.

[Position of Fig. 3]

Cellular distribution of GHRH-R mRNA in cells populations of the renal medulla

Nycodenz-purified thin limb HL and DBA-purified CD cells were used to precise the cellular localization of GHRH-R mRNA in the medulla. Immunocytochemical characterization indicated that $53 \pm 3\%$ of purified HL cells were specifically labeled with the anti-aquaporin-1 antibody, a specific marker of descending thin limb HL cells, while DBA-FITC- and anti vimentin-labeled cells represented $\cong 2\%$ and $26 \pm 3\%$ of purified cells, respectively. Seventy-six $\pm 7\%$ of

DBA-purified cells were labeled with DBA-FITC, while anti aquaporin-1- and anti-vimentin-labeling accounted for $\cong 1\%$ and $12 \pm 3\%$ of cells, respectively. As shown in Fig. 4, GHRH-R mRNA levels were 17.3 and 3.4 times higher in purified HL cells than in CD cells ($P < 0.01$) and total medulla ($P < 0.05$), respectively.

[Position of Fig. 4]

Regulation of GHRH-R mRNA levels in male and female renal medulla during development and comparison with GHRH-R mRNA levels in male anterior pituitary

In the developing male rat, GHRH-R mRNA signals were very low in the medulla from 3- and 12-day-old rats and increased significantly between 30 and 70 days of age (Fig. 5A). When expressed per 20 μg total RNA (Fig. 5B), these levels were 15.3 and 6.0 times lower compared with that of 70-day-old rats, respectively ($P < 0.001$). They were also significantly lower compared with those of 30- and 45-day-old rats ($P < 0.001$). Moreover, GHRH-R mRNA levels were 1.4 times higher in the medulla from 45-day-old rats compared with that of 70-day-old rats ($P < 0.05$). No significant difference was observed between GHRH-R mRNA levels of 30- and 70-day-old rats. When GHRH-R mRNA levels were analyzed per medulla total RNA content (Fig. 5C), they were 213 and 30 times ($P < 0.001$) lower in the medulla from 3- and 12-day-old rats compared with that of 70-day-old rats, respectively and 1.6 times higher in the medulla from 45-day-old rats compared with that of 70-day-old rats ($P < 0.01$).

[Position of Fig. 5]

In the developing female rat, GHRH-R mRNA signal was 1.6 times higher in the medulla from 45-day-old female rats compared with that of 70-day-old female rats ($P<0.01$), when expressed per 20 μg total RNA (Fig. 6A). No significant difference was observed between GHRH-R mRNA levels from 30- and 70-day-old female rats. However, GHRH-R mRNA level was 1.4 times higher in the medulla from 70-day-old male rats compared with that of 70-day-old female rats ($P<0.05$). When GHRH-R mRNA levels were analyzed per medulla total RNA content (Fig. 6B), they were 2.2 times higher in the medulla from 45-day-old than in that of 70-day-old female rats ($P<0.001$) and 1.4 times higher in the medulla of 70-day-old male rats compared with that of 70-day-old female rats ($P<0.001$).

[Position of Fig. 6]

A study of the developmental regulation of GHRH-R mRNA levels was also performed in the anterior pituitary of male rats, allowing a tissue-specific comparison of the process. Levels of pituitary GHRH-R mRNA varied with age. When expressed per 5 μg total RNA, GHRH-R mRNA levels were 1.8 ($P<0.05$) and 2.2 times higher ($P<0.01$) in the pituitary from 3- and 12-day-old rats compared with that of 70-day-old rats and decreased thereafter (Fig. 7A). When GHRH-R mRNA levels were analyzed per anterior pituitary total RNA content (Fig. 7B), they were 13.1 and 5.5 times ($P<0.01$) lower in the pituitary from 3- and 12-day-old rats compared with that of 70-day-old rats, due to the rapid growth of the gland.

[Position of Fig. 7]

Regulation of GHRH-R mRNA levels in male renal medulla during aging

GHRH-R mRNA levels decreased significantly in the medulla from 12- and 18-month-old male rats but not in that of 22-month-old rats (Fig. 8A). When expressed per 20 μ g total RNA (Fig. 8B), GHRH-R mRNA signals were 1.5 times lower in the medulla from 12- and 18-month-old rats compared with those of 2-month-old rats ($P < 0.01$). When GHRH-R mRNA levels were analyzed per medulla total RNA content (Fig. 8C), no significant difference was observed between groups.

[Position of Fig. 8]

In vitro regulation of GHRH-R mRNA levels by GHRH in semi-purified HL cells

The effect of GHRH on the regulation of GHRH-R mRNA levels was investigated in semi-purified HL cells. A 4-h stimulation with 1, 10 and 100 nM rGHRH(1-29)NH₂ induced a 3.2-, 3.7- and 2.0-fold decrease of GHRH-R mRNA levels compared to a 4 h-incubation with the rGHRH vehicle ($P < 0.01$; Fig. 9A, B).

[Position of Fig. 9]

Visualization and internalization of GHRH-R in semi-purified HL cells

Immunocytochemical localization of GHRH-R with the anti-GHRH-R(392-404) primary antibody revealed its presence in semi-purified HL (Fig. 10a). No signal was observed when primary antibodies were substituted with normal goat anti-rabbit IgGs (Fig. 10b).

Internalization of the GHRH-R was assessed using Fluo-GHRH, a high affinity ligand for the human and rat pituitary GHRH-R (34). At 4 C, a maximal removal of fluorescence was obtained in presence of 1 μ M rGHRH(1-29)NH₂ (Fig. 10A, total binding; Fig. 10B, non specific binding). The distribution of GHRH fluorescence varied as a function of incubation temperature. After a 45-min incubation at 4 C, low to moderate levels of fluorescence were diffusely distributed over the cell surface (Fig. 10A). When cells were warmed at 37 C for 90 min, a punctate pattern of fluorescence appeared. This labeling was distributed throughout the cytoplasm sparing the nucleus (Fig. 10D). Internalization of Fluo-GHRH was time-dependent. After 30- incubation at 37 C, cells exhibited a more intense labeling than at 4 C. However this labeling remained largely at the cell surface after 30 and 60 min (Fig. 10C). Fluo-GHRH continued to internalize progressively at 37 C (Fig. 10D, 90-min incubation) and appeared to be completely internalized after a 120-min incubation at 37 C (Fig. 10E). After a 90-min incubation in presence of 10 μ M PAO, labeling was less intense and Fluo-GHRH remained diffuse at the cell surface (Fig. 10F). This effect was specific to PAO, since incubation in presence of 0.1% DMSO alone did not blocked internalization of Fluo-GHRH (data not shown).

[Position of Fig. 10]

DISCUSSION

In this study, we report for the first time that high levels of renal GHRH-R mRNA are localized in HL of the renal medulla, by RPA and *in situ* hybridization. The procedure used to purify thin descending and ascending HL cell has been reported to give highly purified cells (27), however we cannot exclude the potential presence of thick ascending limb cells in our preparation. Moreover, *in situ* hybridization on cryosections allowed to discriminate CD from HL cells but not subpopulations of HL cells.

When these GHRH-R mRNA signals were analyzed by Northern blotting, it was shown that the ≈ 2.5 - and ≈ 4 -kb transcripts initially described in the anterior pituitary by Mayo (3) are both present in the renal medulla. Their total abundance is almost 2 times lower in the medulla than in the pituitary, with the concentration of the 4-kb transcript being 1.3 times lower and that of the 2.5 kb transcript being 2.3 times lower. As data from partial sequencing of renal GHRH-R cDNA revealed a complete homology with that of the pituitary receptor (26), it might be suggested that the same GHRH-R isoforms are generated in both tissues but in different concentrations. Elucidation of complete cDNA/mRNA structures of medullary GHRH-R will be needed to further substantiate this hypothesis. The present results are at variance with those reported by Matsubara *et al.* (26), showing a sole 4-kb transcript in rat medulla, which could be attributed to a lower sensitivity of their assay. Based on immunological data revealing the presence of a 52-kDa and 50-kDa protein in human kidney and pituitary membrane preparations, respectively (35), a tissue-specific GHRH-R heterogeneity resulting from post-translational modifications should also be considered.

RPA was found to represent a sensitive and reliable method to perform a valid quantification of GHRH-R mRNA levels in rat medulla. As for Northern blotting, a single pattern was identified in medulla and pituitary and the relative abundance of protected fragments was 2-3 times lower in the medulla. To help understanding some of the regulatory mechanisms by which GHRH-R mRNA levels are affected in the renal medulla, studies were performed in developing male and female rats and aging male rats, to compare with the pituitary. In the course of development, GHRH-R mRNA levels were low in the medulla during the perinatal period and became elevated around 30-70 days, being maximal at 45 days. GHRH-R mRNA patterns were concordant either using a fixed amount of RNA or medulla total RNA content. The pattern of GHRH-R mRNA expression observed between 30- and 70-day-old in the medulla of male rats was also present in females. However, when GHRH-R mRNA levels were compared in the medulla of 70-day-old males and females, they were significantly higher in males. This observation may suggest the existence of a sexual dimorphism in the medulla as proposed in the pituitary. In the pituitary of 3-month-old female Sprague Dawley rats, GHRH-R mRNA levels were shown to represent 15% of those found in males (36). In 2- and 4-month-old female LOU/C rats, levels of 2.5 and 4 kb GHRH-R mRNA transcripts were 2-3 times lower in females than in males (37). However, an absence of difference in GHRH-R mRNA levels has also been reported in neonate and adult rats (38, 39). These discrepancies might be due to difference in age groups, animals strains, estrus cycles or RNA analysis techniques. Studies in gonadectomized male and female rats submitted or not to an hormonal replacement therapy will be required to determine the tissue-specific impact of gonadal steroids and to assess a sexual

dimorphic expression of GHRH-R in the renal medulla.

In the present study, highest levels of GHRH-R mRNA were seen in the pituitary during the postnatal period between 3- and 12 days of age, with a subsequent decline reaching a nadir at 45-70 days. Previous studies either performed by RPA (23) or RT-PCR (39) showed highest levels of GHRH-R mRNA during the perinatal period (embryonic day 19.5 to 2 days of age) and a subsequent decline between 10 and 75 days of age (23, 39). At variance with Kamegai *et al.* (39), Korytko *et al.* (23) reported a drastic decrease of GHRH-R mRNA levels in the pituitary of 12-day-old rats, followed by a significant increase in that of 30-day-old rats. This latter observation could not be confirmed in the present study. Contrarily to the medulla, a different pattern of GHRH-R mRNA levels was observed in the anterior pituitary when using a fixed amount of RNA or the total tissue content. In total pituitary, GHRH-R mRNA levels increased drastically between 3 and 30 days of age and stabilized thereafter, due to its rapid growth. These results suggest an important contribution of GHRH-R in somatotroph proliferation (9-12). Such a role has been further supported by studies in the *lit/lit* dwarf mouse, showing that a mutated and functionally defective somatotroph GHRH-R prevents both proliferation and terminal differentiation in the mature anterior pituitary (11, 12). In addition, data in the chick suggest that GHRH could also act during the embryonic development to regulate somatotroph differentiation (13). Altogether, these results demonstrated a tissue-specific regulation of GHRH-R mRNA levels during development. Moreover, the presence of low levels of GHRH-R mRNA in the medulla of newborn rats, added to the fact that the rat kidney is fully developed at 20 days of age but reaches its maximal capacity to concentrate urine around 45

days (40), may suggest a preferential role in proliferation of mature cells or in cellular differentiation.

In the renal medulla of aging rats, levels of GHRH-R mRNA diminished but this was compensated by an increase in kidney's size, which doubled in weight between 2 and 12 months. The greater variability observed in GHRH-R mRNA levels from 22-month-old rats may be related to the smaller number of animals compared to other age groups and/or to the fact that some survivors are physiologically younger and maintain higher levels of GHRH-R mRNA. Whether or not a decrease of GHRH-R mRNA concentrations correlate with an age-dependent decreased sensitivity to GHRH or a possible defect in urinary concentrating capacity remain to be explored. Interestingly, in the medullary thick ascending limb of HL from 20-24-month-old mice, the appearance of a defect in the urinary concentrating capacity was associated to a decreased sensitivity to vasopressin (41). In the pituitary of aging male rats, Northern blot analysis showed that the 4 kb GHRH-R mRNA transcript increased significantly between 2 and 18 months of age, while the 2.5 kb transcript increased between 2- and 8-month of age and decreased thereafter (42). A similar pattern was observed in 16- and 24-month-old male F344 rats when compared to 6-month-old rats (43). Since Northern blotting cannot be used for a precise quantification of GHRH-R mRNA levels in the renal tissue, a differential regulation of GHRH-R transcripts, impacting on physiological processes can not be excluded in the aging medulla. However, as the total density of transcripts remains unchanged in the pituitary from 2- and 18-month old rats (24) as well as that of protected GHRH-R mRNA fragments in the pituitary from 70-day- and 12-month-old rats (23), these results rather suggest that a tissue-specific

regulation of GHRH-R mRNA levels also exists in this physiological situation.

In order to help establishing the functionality of the GHRH-R in LH cells, the effect of a stimulation to GHRH, on the regulation of GHRH-R mRNA levels, was investigated. A 4-h exposure to 1, 10 or 100 nM rGHRH(1-29)NH₂ induced a 50-70% decrease of GHRH-R mRNA content, consistent with results obtained in anterior pituitary cell cultures (44, 45), showing that a 4-h exposure to 0.1 and 1 nM rGHRH(1-44)NH₂ induced a ≈50% decreased of GHRH-R mRNA. In somatotrophs, this down-regulation of GHRH-R mRNA levels was shown to be mediated *via* a cAMP-dependant mechanism (44). Preliminary results obtained in our laboratory indicates that GHRH induces a concentration-dependent increased of cAMP production in semi-purified HL cells (data not shown), suggesting that the phenomenon could be mediated at least in part *via* a cAMP pathway. To further document the receptor-mediated action of GHRH in semi-purified HL cells, its presence was assessed by immunocytochemistry, using a specific anti-GHRH-R antibody recognizing the portion 392-404 of the rat and human pituitary (33). The result suggests that GHRH-R species found in the rat medulla share at least partial sequence identity with the pituitary receptor, as proposed for the kidney and pituitary human receptor (35). Finally, assessment of GHRH-R functionality, using a fluorescent GHRH agonist (46), indicated that GHRH is internalized in a specific temperature- and time-dependent manner in HL cells. As PAO, a general inhibitor of endocytosis, blocked internalization of Fluo-GHRH, GHRH-mediated internalization of GHRH-R may be considered as a part of the GHRH desensitization process, together with down-regulation of GHRH-R mRNA. In the anterior pituitary, internalization is dependent upon fatty acid acylation of GHRH-R

(47) but such a mechanism has not been documented yet in HL cells.

The presence in the kidney of a functional GHRH receptor that is regulated in physiological conditions such as development suggests a physiological relevance. GHRH-R could play a role in water and/or electrolytes transport directly or by regulating the expression or function of renal proteins involved in concentrating processes, some of which increase in the rat kidney between 10 and 40 days of age (40, 48). GHRH-R could also mediate, as in somatotrophs (9-13), cell proliferation and/or differentiation, post-nephrogenesis. Since various components of the somatotroph axis are found in HL cells, GHRH could act directly or *via* a GH/IGF-I system (49).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr Kelly E Mayo (Department of Biochemistry, Molecular Biology and Cell Biology, Northwestern University, Evanston, IL) for providing us with the RPR64 rGHRH-R cDNA, to Dr NE Petersen (Department of Biochemistry and Clinical Genetics, Odense University, Odense, Denmark) for supplying us with very helpful documentation on RPA and to Dr P Chartrand (CHUM Research Center, University of Montreal, Montreal, QC, CA) for giving us a GAPDH cDNA.

This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research. The colony of aged rats was supported by a grant from the Dairy Farmers of Canada. A France Quebec exchange program supported the collaboration with G Morel. CB received studentships from Fonds de la Recherche en Santé du Québec and the Faculty of Graduate Studies, University of Montreal. CP received studentship from the Faculty of Graduate Studies, University of Montreal.. CVD and PG are recipients of a post-doctoral fellowship and a scholarship chercheur-boursier national from FRSQ, respectively. SD was recipient of a summer studentship from Fondation Rx&D des Compagnies de Recherche Pharmaceutique du Canada and the Faculty of Medicine, University of Montreal.

REFERENCES

1. Le Cam A, Legraverend C 1993 Mode d'action de l'hormone de croissance. *Med Sci* 9:1352-1361
2. Tannenbaum GS, Ling N 1984 The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology* 115:1952-1957
3. Mayo KE 1992 Molecular cloning and expression of a pituitary specific receptor for growth hormone-releasing factor. *Mol Endocrinol* 6:1734-1744
4. Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S 1992 Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:251-255
5. Bilezikjian LM, Vale WW 1983 Stimulation of adenosine 3', 5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 113:1726-1731
6. Barinaga M, Bilezikjian LM, Vale WW, Rosenfeld MG, Evans RM 1985 Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 314:279-281
7. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R 1973 Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179:77-79
8. Sarret P, Nouel D, Dal Farra C, Vincent JP, Beaudet A, Mazella J 1999 Receptor-mediated internalization is critical for the inhibition of the

expression of growth hormone by somatostatin in the pituitary cell line AtT-20. *J Biol Chem* 274:19294-19300

9. Billestrup N, Swanson LW, Vale W 1986 Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6854-6857
10. Godfrey P, Rahal JO, Beamer WG, Copeland NG, Jenkins NA, Mayo KE 1993 GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nat Genet* 4:227-232
11. Lin SC, Lin CR, Gukovsky I, Lusic AJ, Sawchenko PE, Rosenfeld MG 1993 Molecular basis of the little mouse phenotype and implication for cell type-specific growth. *Nature* 364:208-213
12. Mayo KE, Hammer RE, Swanson LW, Brinster RL, Rosenfeld MG, Evans RM 1988 Dramatic pituitary hyperplasia in transgenic mice expressing a human growth hormone-releasing factor gene. *Mol Endocrinol* 2:606-612
13. Dean CE, Porter TE 1999 Regulation of somatotroph differentiation and growth hormone (GH) secretion by corticosterone and GH-releasing hormone during embryonic development. *Endocrinology* 140:1104-1110
14. Lin C, Lin SC, Chang CP, Rosenfeld MG 1992 Pit-1 dependent expression of the receptor for growth hormone-releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360:765-768
15. Hsiung HM, Smith DP, Zhang XY, Bennett T, Rosteck PR Jr, Lai MH 1993 Structure and functional expression of a complementary DNA for porcine growth hormone-releasing hormone receptor. *Neuropeptides* 25:1-10

16. Horikawa R, Gaylinn BD, Lyons CE, Thorner MO 2001 Molecular cloning of ovine and bovine growth hormone-releasing hormone receptors: the ovine receptor is C-terminally truncated. *Endocrinology* 142: 2660-2668
17. Tang J, Lagacé G, Castagné J, Collu R 1995 Identification of human growth hormone-releasing hormone receptor splicing variants. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2381-2387
18. Hashimoto K, Koga M, Motomura T, Kasayama S, Kouhara H, Ohnishi T, Arita N, Hayakawa T, Sato B, Kishimoto T 1995 Identification of alternatively spliced messenger ribonucleic acid encoding truncated growth hormone-releasing hormone receptor in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2933-2939
19. Gaylinn BD, Harrison JK, Zysk JR, Lyons CE, Lynch KR, Thorner MO 1993 Molecular cloning and expression of human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 7:77-84
20. Miller TL, Godfrey PA, Dealmeida VI, Mayo KE 1999 The rat growth hormone-releasing hormone receptor gene: structure, regulation, and generation of receptor isoforms with different signaling properties. *Endocrinology* 140:4152-4165
21. Motomura T, Hashimoto K, Koga M, Arita N, Hayakawa T, Kishimoto T, Kasayama S 1998 Inhibition of signal transduction by a splice variant of the growth hormone-releasing hormone receptor expressed in human pituitary adenomas. *Metabolism* 47:804-808
22. Zeitler P, Stevens P, Siriwardana G 1998 Functional GHRH receptor carboxyl terminal isoforms in normal and dwarf (dw) rats. *J Mol Endocrinol* 21:363-371

23. Korytko AI, Zeitler P, Cuttler L 1996 Developmental regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression in the rat. *Endocrinology* 137:1326-1331
24. Girard N, Boulanger L, Denis S, Gaudreau P 1999 Differential in vivo regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor by GHRH in young and aged rats. *Endocrinology* 140:2836-2842
25. Petersenn S, Schulte HM 2000 Structure and function of the growth-hormone-releasing hormone receptor. *Vitam Horm* 59:35-69
26. Matsubara S, Sato M, Mizobuchi M, Niimi M, Takahara J 1995 Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology* 136:4147-4150
27. Grupp C, Lottermoser J, Cohen DI, Begher M, Franz HE, Müller GA 1997 Transformation of rat inner medullary fibroblasts to myofibroblasts in vitro. *Kidney Int* 52:1279-1290
28. Grupp C, Troche I, Steffgen J, Langhans S, Cohen DI, Brandl L, Muller GA 1998 Highly specific separation of heterogeneous cell populations by lectin-coated beads: application for the isolation of inner medullary collecting duct cells. *Exp Nephrol* 6:542-550
29. Gaudreau P, Boulanger L, Abribat T 1992 Affinity of human growth hormone-releasing factor (1-29)NH₂ analogues for GRF binding sites in rat adenopituitary. *J Med Chem* 35:1864-1869
30. Iguchi G, Okimura Y, Takahashi T, Mizuno I, Fumoto M, Takahashi Y, Kaji H, Abe H, Chihara K 1999 Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. *J Biol Chem* 274:12108-12114

31. Horikawa R, Hellmann P, Cella SG, Torsello A, Day RN, Muller EE, Thorner, MO 1996 Growth hormone-releasing factor (GRF) regulates expression of its own receptor. *Endocrinology* 137:2642-2645
32. Ouhtit A, Morel G, Kelly PA 1993 Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in the rat. *Endocrinology* 133:135-144
33. Boulanger L, Andersen PH, Gaudreau P 1999 Development of a site-directed polyclonal antibody against the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its use to estimate GHRH receptor concentration in normal and hypothyroid rats. *Neuroendocrinology* 70:117-127
34. Gaudreau P 1998 Marker for growth hormone-releasing factor receptors. USA patent no. 5854216.
35. Fujinaka Y, Yokogoshi Y, Zhang CY, Okura T, Kitagawa K, Saito S 1996 Tissue-specific molecular heterogeneity of human growth hormone-releasing hormone receptor protein. *FEBS Lett* 394:1-4
36. Ono M, Miki N, Murata Y, Osaki E, Tamitsu K, Ri T, Yamada M, Demura H 1995 Sexually dimorphic expression of pituitary growth hormone-releasing factor receptor in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 216:1060-1066
37. Gaudreau P, Veyrat-Durebex C, Denis S, Alliot J, Effect of aging on pituitary growth hormone-releasing factor receptor mRNA levels in male and female Wistar-Lou rats. Program of the 28th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Los Angeles CA, 1998 (Abstract 442-17)
38. Carmignac DF, Flavell DM, Robinson IC 1996 Pituitary growth hormone-releasing factor receptor expression in normal and dwarf rats. *Neuroendocrinology* 64:177-185

39. Kamegai J, Wakabayashi I, Kineman RD, Frohman LA 1999 Growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R) and growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) mRNA levels during postnatal development in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 11:299-306
40. Rane S, Aperia A 1985 Ontogeny of Na-K-ATPase activity in thick ascending limb and of concentrating capacity. *Am J Physiol* 249:F723-728
41. Di Stefano A, Wittner M, Corman B 1991 Vasopressin stimulation of NaCl transport in the medullary thick ascending limb of Henle's loop is decreased in aging mice. *Pflugers Arch* 419:327-331
42. Gaudreau P, Boulanger L, Morel G 1999 Axe somatotrope et vieillissement: importance du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance. *Méd Sci* 15:VII-IX
43. Shimokawa I, Yanagihara K, Higami Y, Okimoto T, Tomita M, Ikeda T, Lee S 2000 Effects of aging and dietary restriction on mRNA levels of receptors for growth hormone-releasing hormone and somatostatin in the rat pituitary. *J Gerontol Biol Sci* 55:B274-279
44. Aleppo G, Moska SF 2nd, De Grandis PA, Kineman RD, Frohman LA 1997 Homologous down-regulation of growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 138:1058-1065
45. Lasko CM, Korytko AI, Wehrenberg WB, Cuttler L 2001 Differential GH-releasing hormone regulation of GHRH receptor mRNA expression in the rat pituitary. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E626-E631
46. Veyrat-Durebex C, P Gaudreau. Receptor-mediated internalization of growth hormone-releasing hormone receptor: preferential mechanisms in hGHRH-receptor-transfected BHK cells and rat anterior pituitary. *Peptide*

Receptor 2001 International Symposium, Montreal, July 29-August 2, 2001
(Abstract P-17).

47. Saemark T, Jacobsen C, Magee A, Vilhart H 1990 Internalization of growth hormone-releasing factor by rat anterior pituitary cells: inhibition by cerulenin, an inhibitor of fatty acid acylation. *J Mol Endocrinol* 4:51-59
48. Yasui M, Marples D, Belusa R, Eklof AC, Celsi G, Nielsen S, Aperia A 1996 Development of urinary concentrating capacity: role of aquaporin-2. *Am J Physiol* 271:F461-F468
49. Feld S, Hirschberg R 1996 Growth hormone, the insulin-like growth factor system, and the kidney. *Endocrine Reviews* 17:423-480

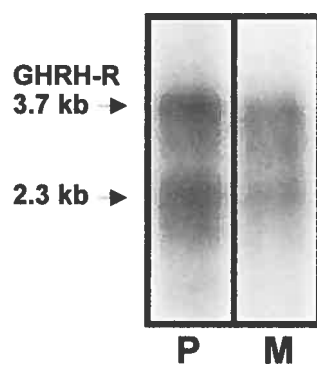


Fig. 1. Northern blot autoradiographic representation of pituitary (P) and renal medulla (M) GHRH-R mRNA transcripts. An average of 4 pituitaries and medullas from 2-month-old male rats were pooled and 1.5 μ g of poly (A) RNA was analyzed by Northern blotting. Representative of 2 independent experiments.

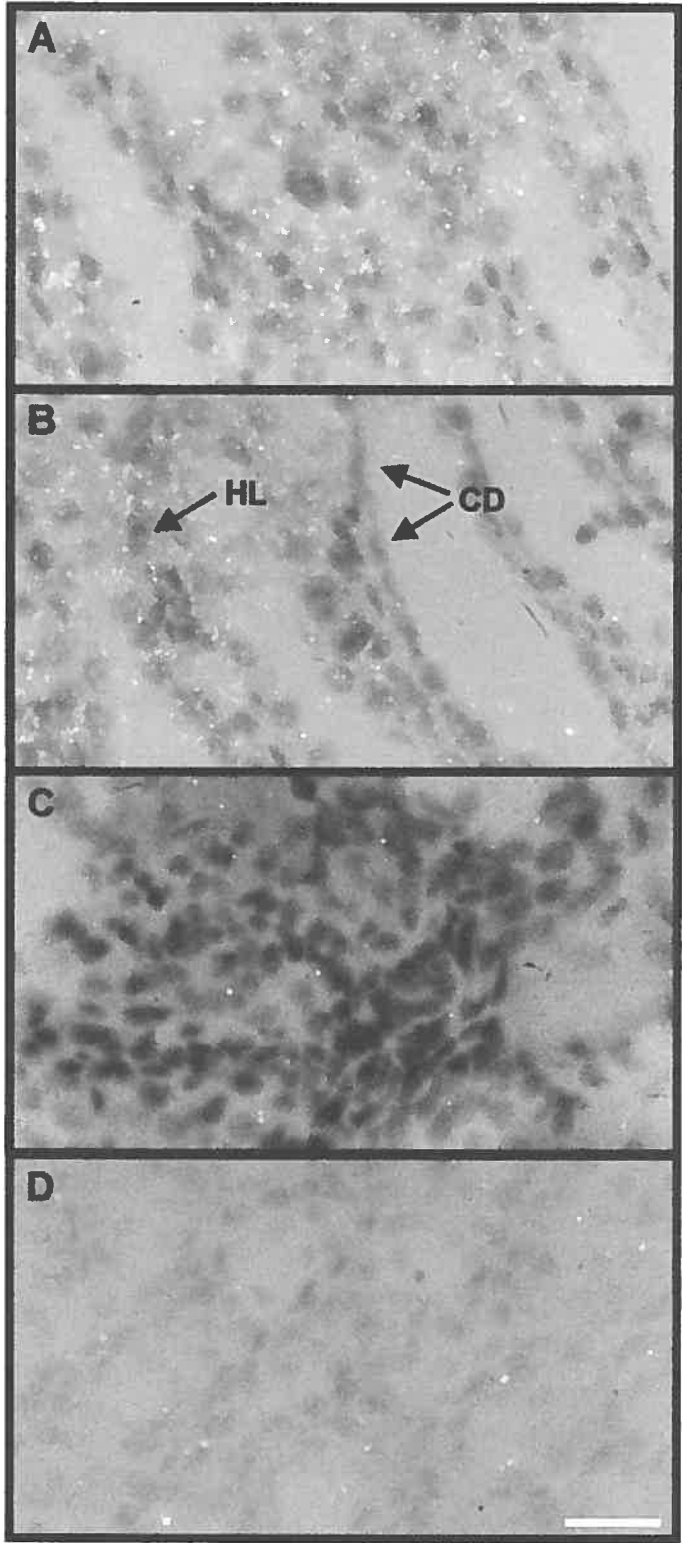


Fig. 2. *In situ* localization of GHRH-R mRNA in the rat kidney. Kidneys from 2-month-old male rats were used. Labeling of GHRH-R mRNA with the antisense RPR64 riboprobe in A) HL cells of the medulla, B) CD and HL cells of the medulla and C) glomerular cell of the cortex or D) in the medulla with the sense RPR64 riboprobe. Bar, 50 μ M. Representative of 3 independent experiments. CD, collecting duct. HL, Henle's loop.

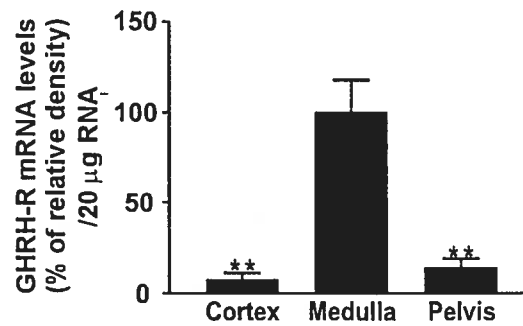


Fig. 3. Quantification of GHRH-R mRNA levels in the rat kidney. An average of 8 cortex, medulla and pelvis from 70-day-old male rats were pooled. Twenty μg of total RNA was analyzed by RPA. Results were expressed in % of relative density to that obtained in the medulla and represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments performed in duplicate.

** $P < 0.01$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the medulla (Dunnett's test).

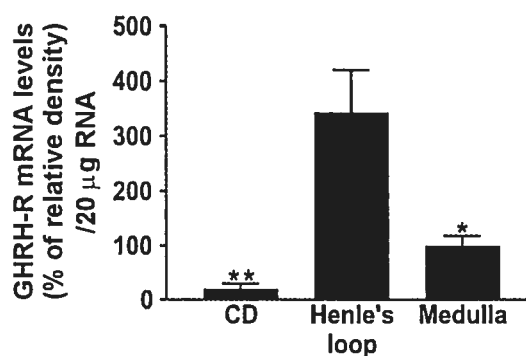


Fig. 4. GHRH-R mRNA levels in purified CD and HL cells and in total medulla. Twenty-four medullas from 70-day-old male rats were pooled for each purification. Twenty μg of total RNA was analyzed by RPA. Results were expressed in % of relative density to that obtained in the medulla and represent the mean \pm SEM of 2 independent experiments performed in duplicate and using 2 independent groups of rats. CD, collecting duct. HL, Henle's loop.

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ when compared with GHRH-R mRNA levels in HL cells (Dunnett's test).

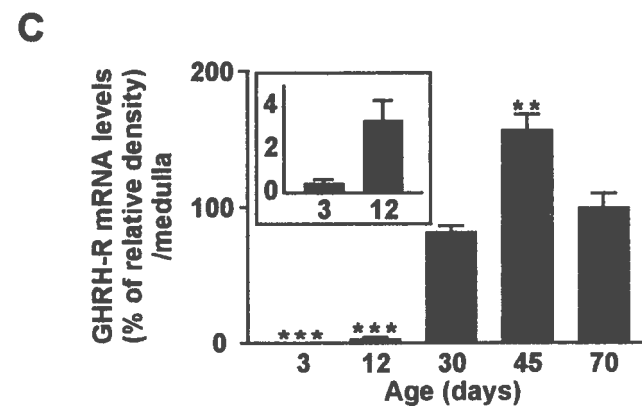
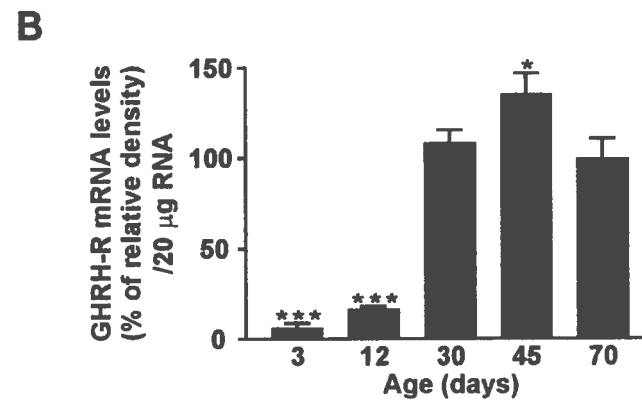
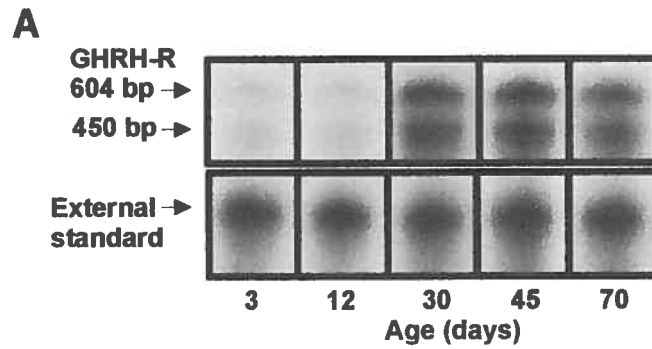


Fig. 5. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla of the developing male rat. An average of 20 and 6 medullas from 3- to 45- and 70-day-old rats were pooled, respectively. Twenty μg of total RNA was analyzed by RPA for each age group. A) autoradiographic representation of GHRH-R mRNA and RPR-64 Msc I RNA standard (40 pg) signals, in various age groups. B) GHRH-R mRNA densities expressed per 20 μg total RNA or C) per medulla total RNA content, in % of relative density to that obtained in the medulla from 70-day-old rats. Results represent the mean \pm SEM of 9 experiments performed in triplicate, using 3 independent pools.

* $P < 0.05$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the medulla from 70-day-old rats (Student's t test).

** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the medulla from 70-day-old rats (Tukey's test).

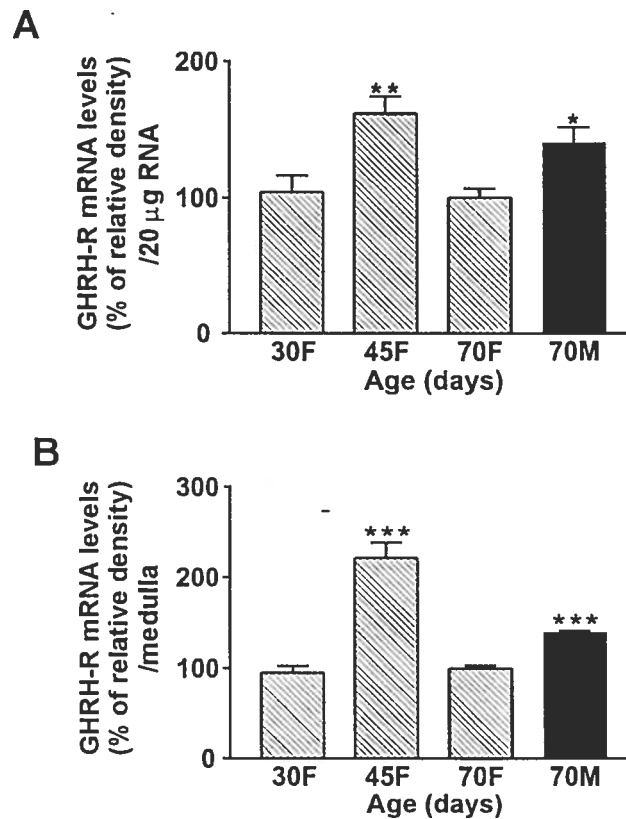


Fig. 6. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla of the developing female rat. An average of 6 medullas from 30- to 70-day-old rats was pooled. Twenty μg of total RNA was analyzed by RPA for each age group. Results were expressed A) per 20 μg total RNA or B) per medulla total RNA content, in % of relative density to that obtained in the medulla from 70-day-old female rats. They represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments performed in triplicate. F, female. M, male.

* $P < 0.05$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the medulla from 70-day-old female rats (Student's t test).

** $P < 0.01$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the medulla from 70-day-

old female rats (Tukey's test).

*** $P < 0.001$ when GHRH-R mRNA levels from 45-day-old female were compared to those of 70-day-old female rats (Tukey's test).

*** $P < 0.001$ when GHRH-R mRNA levels from 70-day-old male were compared to those of 70-day-old female rats (Student's test).

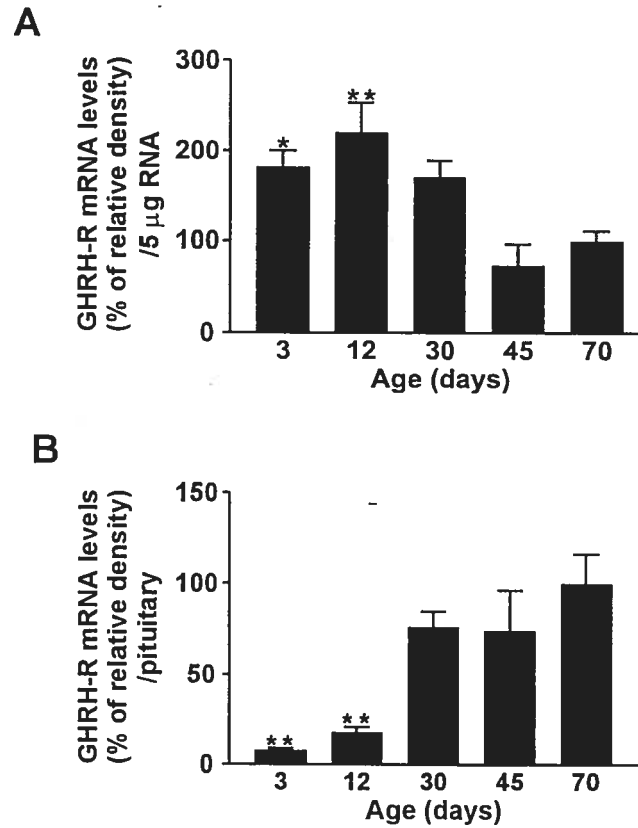


Fig. 7. GHRH-R mRNA levels in the anterior pituitary of the developing male rat. An average of 10 and 3 anterior pituitaries from 3- to 45- and 70-day-old rats were pooled, respectively. Five μg of total RNA was analyzed by RPA for each age group. Results were expressed A) per 5 μg total RNA or B) per anterior pituitary total RNA content, in % of relative density to that obtained in the pituitary from 70-day-old rats. They represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments performed in triplicate.

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the anterior pituitary from 70-day-old rats (Dunnett's test).

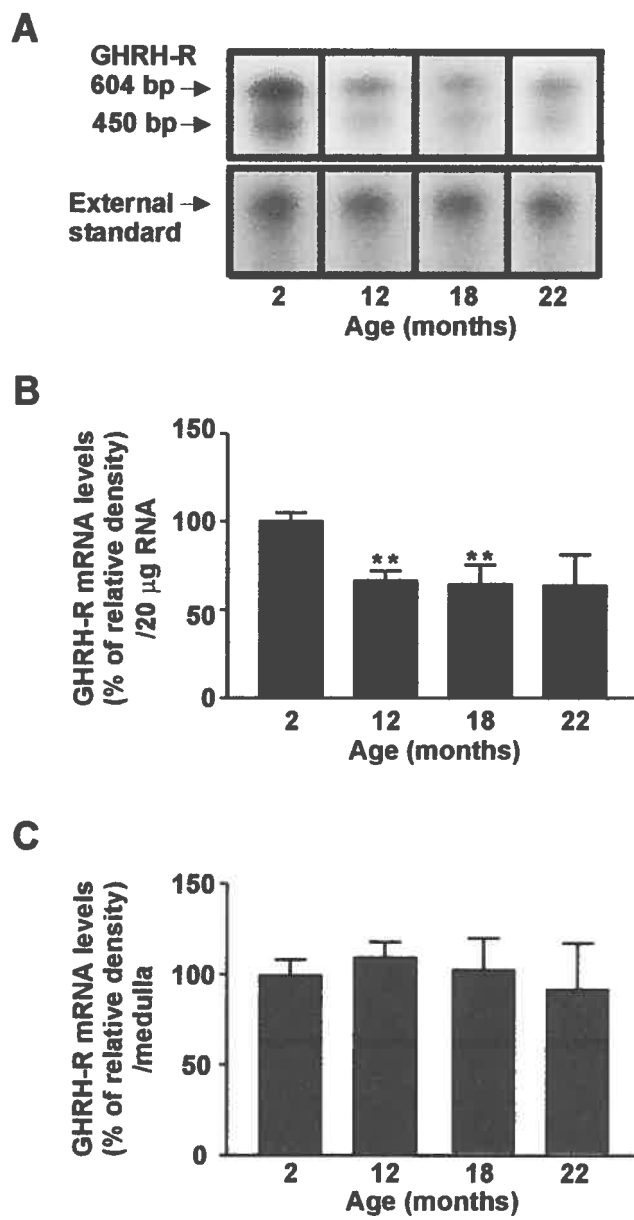


Fig. 8. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla of aging male rat. Medullas from each rat were pooled. At least three rats were used in each age group. Twenty μg of total RNA from each rat was analyzed by RPA. A) autoradiographic representation of GHRH-R mRNA and RPR-64 Msc I RNA (40 pg) standard signals, in various age groups. B) GHRH-R mRNA densities expressed per 20 μg total RNA or C) per medulla total RNA content, in % of relative density to that obtained in the medulla from 2-month-old rats. Results represent the mean \pm SEM of 2 independent experiments performed in triplicate. $**P < 0.01$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the medulla from 2-month-old rats (Tukey's test).

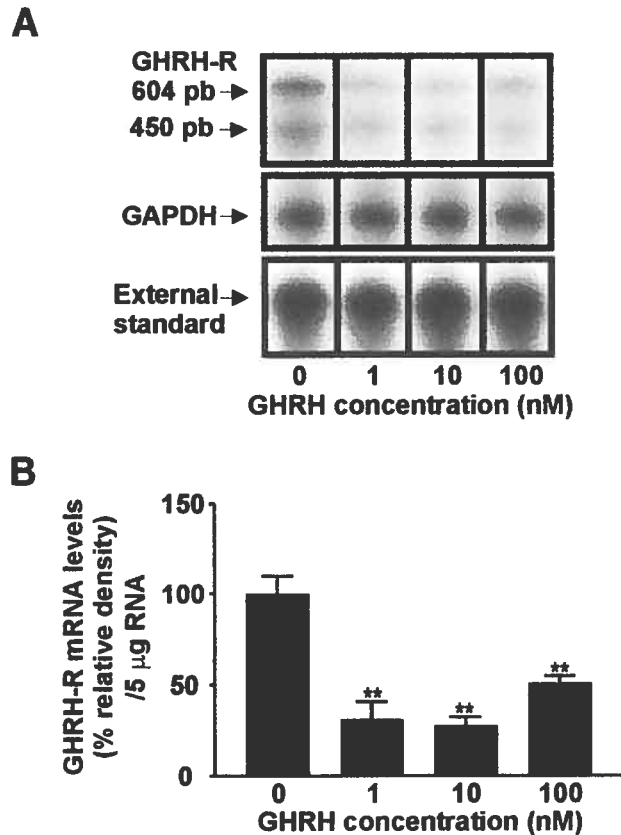


Fig. 9. GHRH-R mRNA levels in semi-purified HL cells treated with GHRH. Semi-purified HL cells from 2-month-old male rats (2 medulla equivalent) were incubated 4 h in presence of 1, 10 or 100 nM of rGHRH(1-29)NH₂ or the vehicle, in serum-free medium. Five µg of total RNA was analyzed by RPA. Autoradiographic representation of GHRH-R mRNA, GAPDH mRNA and RPR-64 Msc I cRNA (40 pg) signals of control and GHRH-treated cells (A). B) GHRH-R mRNA densities expressed per 5 µg total RNA. Results were expressed in % of relative density to that obtained in control HL cells and represent the mean ± SEM of 2 (1-10 nM) or 3 independent experiments performed in duplicate or triplicate. ***P* < 0.01 when compared with GHRH-R mRNA levels in control cells (Tukey's test).

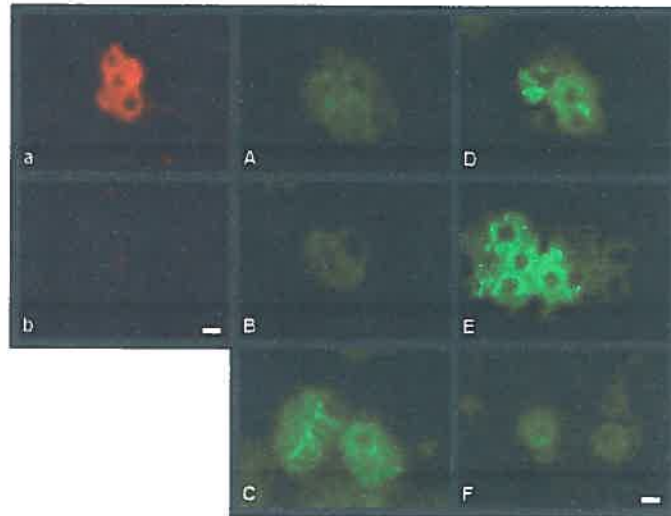


Fig. 10. Visualization of GHRH-R in semi-purified HL cells with the anti-GHRH-R(392-404) antibody and Fluo-GHRH. a) GHRH-R was visualized in semi-purified HL cells from 2-month-old male rats with the anti-GHRH-R(392-404) antibody and AlexaTM-conjugated goat anti-rabbit IgGs. b) Specificity of labeling was assessed by substituting the primary antibody with normal goat anti-rabbit IgGs. Bar, 10 μ m. Representative of 3 independent experiments.

Fluorescence imaging of Fluo-GHRH in semi-purified HL cells. Cells were incubated at 4 C for 45 min in presence of 1 nM Fluo-GHRH and in A) absence or B) presence of 1 μ M rGHRH(1-29)NH₂ or incubated at 4 C for 45 min and warmed at 37 C for C) 30, D) 90 or E) 120 min or F) warmed up at 37 C for 90 min in presence of 10 μ M PAO. Bar, 10 μ m. Representative of 3 independent experiments.

Localization of the rat growth hormone-releasing hormone receptor in the loop of Henle and its tissue-specific regulation by high dietary NaCl intake but not water deprivation

Chantale Boisvert, Christelle Veyrat-Durebex, Julie Strecko and Pierrette Gaudreau

Laboratory of Neuroendocrinology of aging, CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital and Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada. -

Correspondence and request for reprints should be addressed to:

Dr Pierrette Gaudreau, Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital, Rm-5226, 1560 east Sherbrooke street, Montreal, Quebec, Canada, H2L 4M1.

Tel: (514) 890-8000 extension 27159

Fax: (514) 412-7661

e-mail: [REDACTED]

Running title: Localization of GHRH receptor in Henle's loop and its regulation.

Key words: growth hormone-releasing hormone, GHRH receptor, mRNA, protein, renal medulla, thin ascending loop of Henle, pituitary, NaCl dietary, water deprivation.

Titre de l'article: Localization of the rat growth hormone-releasing hormone receptor in the loop of Henle and its tissue-specific regulation by high dietary salt intake and water deprivation. Soumis à "Endocrinology"

Auteurs: Boisvert C, Veyrat-Durebex C, Strecko J, Gaudreau P.

Participation: La majorité des expériences, l'analyse et l'interprétation des résultats de même que la rédaction de l'article ont été effectués par Chantale Boisvert. Christelle Veyrat-Durebex a participé à la mise au point de la détection immunologique du GHRH-R. Julie Strecko a participé aux expériences de protection à la RNase et de buvardage Northern et à la rédaction de l'introduction de l'article. Pierrette Gaudreau a supervisé les étapes de réalisation de l'étude et de rédaction de l'article.


Chantale Boisvert


Christelle Veyrat-Durebex


Julie Strecko


Pierrette Gaudreau

ACCORD DES COAUTEURS

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Chantale Boisvert
BCM, Biochimie


2. Description de l'article

Boisvert C, Veyrat-Durebex C, Strecko J, Gaudreau P. Localization of the rat growth hormone-releasing hormone receptor in the loop of Henle and its tissue-specific regulation by high dietary salt intake and water deprivation. Soumis à "Endocrinology"

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Chantale Boisvert** inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Localisation, régulation et fonction du récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat".

 28/01/03
Coauteur Signature Date

 28-01-03
Coauteur Signature Date

 28/01/03
Coauteur Signature Date

ABSTRACT

The presence of a functional growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R), was recently reported in semi-purified Henle's loop (HL) cells. In this subsequent study, a preparation of purified thin and thick HL rat cells was used to demonstrate that a high level of GHRH-R mRNA was restricted to the former. In these cells, GHRH-R immunoreactivity was exclusively co-localized with the chloride channel, ClC-k1, a specific marker of the thin ascending HL. To gain information on functions of this GHRH-R, the regulation of medullary GHRH-R mRNA levels was studied and compared to that of anterior pituitary, using *in vivo* models of Na⁺/Cl⁻ or water homeostasis disruption. Medullary GHRH-R mRNA cell levels, assessed by RNase protection assay, were decreased 1.4 times ($P<0.01$), increased 1.3 times ($P<0.05$) or not affected by a 2-, 7- or 14-day 8%-NaCl dietary intake, respectively. A 3-day water deprivation was devoid of effect. Pituitary GHRH-R mRNA cell levels, assessed by Northern blotting, remained unchanged following 2- to 14-day 8%-NaCl dietary intake but increased 3 times ($P<0.001$) after a 3-day water deprivation. The unique localization of the renal GHRH-R and its specific regulation by a high-NaCl diet allow to suggest a potential biological role in ascending thin HL chloride transport.

INTRODUCTION

The pituitary growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R) has been cloned in rat (1, 2), mouse (2), porcine (3), bovine (4), ovine (4) and human pituitary (1, 5, 6) and in human pituitary adenomas (5-7). The rat pituitary contains a major GHRH-R mRNA transcript (2.5 kb) and a less abundant one (4 kb) (1). While the 2.5-kb transcript generates the 423 amino acid functional GHRH-R (8), the role and structure of the 4-kb transcript remain to be elucidated. The 47-kDa-encoded rat protein belongs to the subfamily B-III of G-protein-coupled receptors, which also include receptors for VIP, secretin, glucagon, GIP, PTH, calcitonin, CRF and PACAP (1). In somatotrophs, specific binding of hypothalamic GHRH to functional plasma membrane receptor represents the primary event leading to GH secretion (9, 10) and synthesis (10) through an adenylate cyclase/cAMP/protein kinase (PK) A pathway (11-14). The activation of a PKC pathway following the activation of GHRH-R has also been proposed (15). GHRH is also involved in somatotroph proliferation and differentiation *via* PKA (16-20) and mitogen-activated protein kinase pathways (21, 22).

Apart from the anterior pituitary, a GHRH-GHRH-R system has been identified in the brain (23, 24), spleen and thymus (25), ovary (26, 27), placenta (28, 29), testis (30, 31) and renal medulla (32, 33). Intranasal administration of GHRH, stimulates dietary protein intake in free-feeding rats (23) while it promotes sleep in the intrapreoptic region (24). In rat spleen and thymus, a functional GHRH-GH axis was shown to mediate lymphocyte proliferation through a GHRH-induced GH mechanism (25). In human and rat

ovary, the detection of GHRH binding sites suggests a receptor-mediated action of GHRH on follicular maturation (26, 27). Placental GHRH may play a role in the growth of this tissue (28, 29). Finally, the presence of locally synthesized GHRH in the testis and that of GHRH binding sites suggest a role in spermatogenesis and steroidogenesis (30, 31).

Recently, a functional GHRH-R has been identified in rat renal medulla (32, 33). Boulanger *et al.* demonstrated the presence of a specific, reversible and saturable binding for [¹²⁵I-Tyr¹⁰]hGHRH(1-44)NH₂ in rat renal medulla homogenates (32). Moreover, the stimulation of semi-purified Henle's loop (HL) cells with GHRH was shown to lead to GHRH-R internalization and regulation of its expression (33). The highest level of renal GHRH-R mRNA was localized in HL by ribonuclease protection assay and *in situ* hybridization (33).

The tissue-specific regulation of pituitary and renal GHRH-R mRNA during development and aging suggests that the GHRH-R may exert a specific function in the renal medulla (33). Its localization in the HL suggests roles in water/electrolyte transport and/or cellular proliferation/maturation of HL cells. To help verifying whether or not this functional GHRH-R may play a role in water and/or ion transport of the HL, specific aims of the present study were 1) to assess the precise localization of the GHRH-R in the HL and 2) to obtain additional information on roles of GHRH-R in ascending thin HL, by studying the regulation of medullary GHRH-R mRNA levels and comparing it with that in the anterior pituitary, using *in vivo* models of Na⁺/Cl⁻ or water homeostasis disruption, as obtained by a 8%-NaCl dietary supplementation for 2, 7 or 14 days or a water deprivation for 3 days.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animal handling and tissue preparations

Two-month-old male Sprague Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Canada) were kept in temperature- (22 C), humidity- (65%) and lighting- (12 h cycles; lights on at 0700 h) controlled rooms and had free access to food. They were housed individually in metabolic cages, in a single room, for the entire duration of protocols. After 3 to 4 days of acclimatization, rats were submitted either to a high-NaCl diet or water deprivation. In the first condition, rats were maintained on the AIN-76A standard rat chow containing 0.3% NaCl (control diet) or the AIN-76A containing 8% NaCl (Harlan Teklad, Madison, WI) for 2, 7, or 14 days and had free access to water. Body weight, food and water intakes and urine volume were recorded daily. Urine Na⁺ analysis was performed on the last 24-h samples before sacrifice. In the second condition, rats were water-deprived for 3 days and had free access to standard rat chow. Body weight was recorded daily. Rats were sacrificed in a block-design fashion between 0900-1200 h by rapid decapitation. Pituitaries, kidneys and livers were excised immediately and anterior pituitaries and renal medullas dissected out. All tissues were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 C until RNA extraction.

For isolation of medullary thin and thick HL, two-month-old male Sprague Dawley rats (Charles River Canada), housed in plastic cages in the standard controlled conditions described above, had free access to standard rat chow and water. Rats were sacrificed in a block-design fashion between 0900-1200 h by rapid decapitation. Kidneys were excised immediately and the renal medulla

dissected out. For isolation of thin HL cells, medullas were washed and minced in oxygenated ice-cold *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethane sulfonic acid (HEPES)-Ringer buffer (118 mM NaCl, 16 mM H-HEPES, 16 mM Na-HEPES, 14 mM glucose, 3.2 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.8 mM MgSO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 290 mosm, pH 7.4) (33, 34). For isolation of thick ascending HL tubules, inner stripes of outer medullas were dissected out and kept in oxygenated Hanks solution (137 mM NaCl, 0.3 mM Na₂HPO₄, 4.2 mM NaHCO₃, 5.4 mM KCl, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.4 mM MgSO₄, 0.5 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, 5 mM glucose, pH 7.0) (35).

Isolation of medullary thin HL cells

Cell dispersion was performed using 12 2-month-old male rats as previously described (33, 34). Minced medullas were incubated at 37 C in HEPES-Ringer collecting buffer, containing 0.2% (wt/vol.) collagenase II (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Canada) and 0.2% hyaluronidase (ICN Pharmaceuticals, Montreal, Canada) for 75 min. After 30 min, 0.001% DNase (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Canada) was added to dissociate cell aggregates. Cells were also mechanically dispersed every 30 min by gentle pipetting with a 5-ml plastic pipette. Microscopic evaluation of the final suspension, using a Neubauer chamber, showed a majority of single cells and few aggregates (≤ 20 cells). The cell suspension was centrifuged at 28 X *g* for 2 min (16 C) and the pellet resuspended in 15 ml of HEPES-Ringer collecting buffer. This step was repeated twice and the two first supernatants were kept for purification of thin HL cells. The supernatants were centrifuged at 150 X *g* for 10 min (16 C) and washed twice in HEPES-Ringer buffer. This pellet was resuspended in 2 ml HEPES-Ringer buffer and used to purify thin HL cells by differential centrifugation, using a continuous

gradient of Nycodenz. The gradient was prepared by solubilizing 28% (wt/vol.) Nycodenz [5-(N-2, 3-dihydroxypropylacetamido)-2,4,6-tri-iodo-N, N'-bis (2,3-dihydroxypropyl)-isophthalamide (Invitrogen Life Technologies) in 5 mM Tris.HCl buffer, containing 0.3 mM CaNa₂-EDTA and 3 mM KCl, pH 7.4. Twenty and 8% solutions of Nycodenz were prepared by appropriate dilutions with 7.45% (wt/vol.) sucrose solubilized in the Tris.HCl buffer (34). Thin HL cells were recovered in fraction I of the gradient after centrifugation at 1500 X g (16 C, 45 min) and washed twice in HEPES-Ringer buffer (430 X g, 16 C, 10 min) (34). Cell viability was assessed by the trypan blue exclusion method.

Isolation of medullary thick ascending HL tubules

Cell dispersion was performed using 13 2-month-old male rats, according to Trinh-Trang-Tan *et al.* (35) with some modifications. Inner stripes of outer medullas were dissected out using an American Optical stereomicroscope, minced and kept in oxygenated Hanks solution. They were incubated at 37 C in Hanks solution, containing 0.025% (wt/vol.) collagenase II (Invitrogen Life Technologies) for 15 min. Cells were mechanically dispersed at the end of the digestion period by gentle pipetting with a 10-ml plastic pipette. The supernatant was collected after a 1-min sedimentation. This procedure was performed 5 times. Supernatants were poured on the top of a 100 µm-pore nylon membrane (Millipore, Nepean, Canada) and washed with Hanks-1% BSA solution using a syringe adapted to a 25G needle. Thick ascending HL cells were detached from the membrane by washing with Hanks-1% BSA solution. The suspension was centrifuged at 80 X g for 5 min (4 C) and the pellet resuspended in 1-2 ml of ice-cold Hanks solution. Cell viability was determined by trypan blue exclusion.

Immunocytochemical procedures

Two immunological markers of HL, an anti-aquaporin-1 antibody (specific to thin descending HL) (36) and an anti-CIC-k1/-k2 (CIC-k) antibody (specific to ascending HL) (37, 38) antibodies (Alamone Labs, Jerusalem, Israel), were directly conjugated to the fluorochrome Alexa 488, using the AlexaTM488 Protein Labeling Kit (Molecular Probes, Eugene, OR), according to the manufacturer's protocol. Briefly, 3 and 5 μ l of dried Alexa Fluor 488 succinimidyl ester (solubilized in DMSO) were respectively added to 30 μ g of the anti-CIC-k and 50 μ g of the anti-aquaporin-1 antibody, solubilized in 0.1 M sodium bicarbonate buffer (pH 8.3), at a concentration of 1mg/mL. Reaction proceeded 2h at room temperature (RT) with gently manual agitation every 10 min. Labeled antibodies were purified on molecular size exclusion spin columns (5 min, 1100 X g).

Purified thin HL cells were fixed in fresh 4% paraformaldehyde-phosphate-buffered saline (20 min, RT), and washed twice with PBS and centrifuged (800 X g, 4 C, 5 min). Thin HL cells (\approx 200,000) were spun onto glass slides by cytocentrifugation (32 X g, RT, 2 min) and permeabilized in 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, Canada) (15 min, RT). Slides were then washed in PBS (4 x 5 min, RT), blocked with 5% (wt/vol.) BSA (Sigma-Aldrich Canada Ltd)-PBS (RT, 30 min) and washed in PBS (2 x 10 min). GHRH-R was detected using 0.5 μ g of the purified anti-GHRH-R(392-404) polyclonal antibody in 100 μ l PBS, containing 1% BSA, incubated overnight (o/n) at 4 C, in a humid atmosphere (33, 39). Cells were rinsed in PBS (2 x 10 min), incubated 60 min, RT, in the presence of Alexa 568TM-conjugated goat anti-rabbit IgGs (Molecular

Probes) (1:15000 in PBS-BSA 1% buffer) and washed in PBS (2 x 10 min). Thin descending HL cells were visualized using a rabbit polyclonal Alexa 488TM-conjugated anti-aquaporin-1 antibody (1:2000 diluted in PBS-BSA 1%, 37 C, 60 min) while thin ascending HL were visualized using a rabbit polyclonal Alexa 488TM-conjugated anti-CIC-k antibody (1:500 diluted in PBS-BSA 1%, 37 C, 60 min). A final wash of slide-mounted cells was done in PBS (2 X 10 min). Specificity of labeling was assessed by substituting GHRH-R (392-404) polyclonal antibodies with normal IgGs. All procedures with fluorescent probes were performed in the dark. Cells were visualized using a Nikon Eclipse E600 (Nikon Canada Inc., Montreal, Canada)-fluorescence/light microscope equipped with filters for excitation/emission of fluorescein (485/520 nm) and Texas Red (595/660).

Ribonuclease protection assay

Total RNA from medullas and HL purified cells was isolated using a single step acid guanidinium-phenol/chloroform method with TRIzol (Invitrogen Life Technologies). GHRH-R mRNA levels were assessed using the RPR64 probe corresponding to the 3'-end of the rat GHRH-R complementary DNA (cDNA) (nucleotide position: 1044-1611) (1). The antisense RPR64 [³²P]-labeled riboprobe was generated by in vitro transcription of *BamH* I-linearized RPR64-pGEM3z plasmid, using T7 RNA polymerase (MAXIscript transcription kit, Ambion, Austin, TX), in the presence of α -[³²P]UTP (800 mCi/mmol; Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfé, Canada). Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) mRNA levels were assessed as internal standard, using a probe spanning the region of exons 5-8 of the rat GAPDH cDNA (nucleotide position: 369-685). The antisense labeled probe was generated by in vitro transcription of the Xba I-

linearized p-TRI-GAPDH plasmid (Ambion), using T7 RNA polymerase. Riboprobes were purified on 5% denaturing polyacrylamide gel and eluted with the buffer supplied in the RPA II kit (Ambion). The specific activity of the RPR64 riboprobe, determined after trichloroacetic acid precipitation onto GF/B Whatman filters (Fisher Scientific Ltd, Montreal, Canada), was $229 \pm 30 \times 10^5$ cpm/ μ g RNA and the percentage of α - [32 P]UTP incorporation was $74 \pm 3\%$. The specific activity of the GAPDH riboprobe was $9 \times 10^5 \pm 1$ cpm/ μ g RNA and the percentage of α - [32 P]UTP incorporation was $13 \pm 3\%$. RPA was performed as previously described (33), using the RPA II kit (Ambion). Twenty μ g total RNA from renal medulla or purified thick HL or liver, 5 μ g total RNA from purified thin HL or anterior pituitary were hybridized overnight at 50 C, after denaturation at 95 C for 3 min, with 1 pM [32 P]GHRH-R and 1 pM [32 P]GAPDH riboprobes. To normalize GHRH-R mRNA levels for experimental variations, 40 pg of a RPR64 Msc I cRNA standard (nucleotide position of RPR-64 cDNA: 1044-1203) was added to RNA sample before hybridization. Nonannealed nucleic acids were digested with RNase A (1 U/ml) and RNase T (40 U/ml) at 37 C for 30 min. Stable hybrids were resolved on 1.5 mm 5% polyacrylamide-8 M urea denaturing gels. Autoradiography was performed at -80 C using Biomax MS-1 films (Eastman Kodak, Rochester, NY) and an intensifying screen. Tissue GHRH-R and GAPDH mRNA and cRNA external standard levels were quantified by densitometry, using an IS1000 digital imaging system (Alpha Innotech Corp/Canberra Packard, Montreal, Canada). The intra-assay coefficients of variation of normalized GHRH-R mRNA levels and GAPDH were $\leq 10\%$ in all experiments. Specificity of the [32 P]GHRH-R probe was assessed in each experiment using positive (5 μ g pituitary total RNA) and negative

(20 µg liver total RNA) controls. In addition, linearity of protected signals was verified in each experiment, using 10-30 µg medulla total RNA. Results were expressed in percentage of relative density to the control condition or tissue preparation using a fixed amount of total RNA. Results were also expressed as total GHRH-R mRNA relative densities per renal medulla total RNA content.

Northern blot hybridization

Total RNA was isolated from anterior pituitary and liver using TRIzol (Invitrogen Life Technologies). Northern blot hybridization was performed as previously described with minor modifications (40). Aliquots of 12 µg total RNA were denatured by heating (65 C, 10 min) in a 50% formamide/17.5% formaldehyde/15 mM MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) buffer (pH 7.0), containing 5 mM sodium acetate and 1 mM EDTA. They were subjected to electrophoresis on 1.2% agarose/ 17.5% formaldehyde gels, using 33 mM MOPS buffer, pH 7.0. RNA was transferred by capillary elution to a nylon membrane (Hybond-NX, Amersham Pharmacia Biotech Inc) and covalently attached by UV cross-linking (Stratagene, La Jolla, CA) and heating (80 C, 2h). Prehybridization was performed in Robbins' hybridization solution (7% SDS containing 0.25 M Na₂HPO₄ (pH 7.4), 1 mM EDTA (pH 8.0) and 1% BSA) at 65 C, 2 h. Blots were hybridized with the RPR64 probe (1). The probe was labeled with α-[³²P]deoxy-CTP (3000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech), using random hexamer primers and the Klenow fragment of *E.coli* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies), and purified by chromatography using a G-50 column (Amersham Pharmacia Biotech). Hybridization was performed in fresh Robbins' solution at 65 C, overnight, in presence of 10X10⁶cpm [³²P]RPR64/ml of solution. Membranes

were subsequently washed (2X SSC (standard saline citrate (SSC) (1X SSC: 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate), pH 7.0)/0.1% SDS, 23 C, 2x10 min; 1X SSC/0.1% SDS, 65 C, 1-2x10 min; 0.5X SSC/0.1% SDS, 65 C, 1-2x10 min) and exposed to Biomax MS-1 films (Eastman Kodak, Rochester, NY) at -80 C with an intensifying screen. Membranes were then stripped in a boiling aqueous solution of 0.1% SDS (60 min) and sequentially rehybridized with rat GAPDH and 28S rRNA (American Type Culture Collection, Rockville, MD) [³²P]probes. Amounts of GHRH-R mRNA were normalized in each lane with 28S rRNA since the intra-group coefficient of variation of GAPDH varied between 4 and 16%. Quantification of each GHRH-R mRNA transcript (2.5 and 4 kb), GAPDH mRNA and 28S rRNA levels was performed by densitometry, using an IS1000 digital imaging system (Alpha Innotech Corp/Canberra Packard). The intra- and inter-assay coefficients of variation of normalized GHRH-R mRNA levels and 28S rRNA were $\leq 10\%$ in all experiments. Specificity of the [³²P]RPR64 cDNA probe was assessed in each experiment using 5 μ g liver total RNA. Linearity of protected signals was verified routinely, using 6-18 μ g total RNA. Results were expressed in percentage of relative density to those of control groups, using a fixed amount of total RNA. Results were also expressed as total GHRH-R mRNA relative densities per anterior pituitary total RNA content.

Data analysis and statistics

RPA has been shown to represent a more sensitive and reliable method to perform a valid quantification of GHRH-R mRNA levels in rat medulla and Henle's loop cells compared to Northern blot (33). However, Northern blot is preferred to

study the pituitary GHRH-R mRNA as it allows the detection of both 2.5- and 4-kb transcripts (40). The validity of comparing GHRH-R mRNA levels, using RPA and Northern blotting, was addressed using pituitary total RNA. In the pituitary from 3-day water-deprived rats, GHRH-R mRNA levels obtained from Northern blots (sum of densities of the two transcripts: 3.0 ± 0.2 times higher than controls) were not significantly different from those obtained by RPA (sum of densities of the two protected fragments: 3.1 ± 0.3 times higher than controls), supporting that medullary and pituitary GHRH-R mRNA levels can be compared.

Results were expressed as mean \pm SEM. Comparisons of GHRH-R mRNA levels between animal groups or cell populations and tissue were performed by ANOVA, followed by the Dunnett's multiple range test or by the unpaired Student's *t* test. Statistical significance of differences was established at $P < 0.05$.

RESULTS

Physiological parameters

Body weight, food and water intakes, urine flow rate and urine sodium rate of rats submitted to a 8%-NaCl dietary intake and body weight and food intake of water-deprived rats are shown in Table 1. As previously observed (41, 42), water intake, urine flow rate, urine sodium excretion rates of rats submitted to a 8%-NaCl diet were increased ($P<0.001$) compared to controls. Body weight and food intake did not differ among the two groups for a specific duration of diet. As previously reported (43), body weight of water-deprived rats was decreased as compared with controls ($P<0.0001$). Their food intake was also decreased ($P<0.001$), providing an interpretation for lower body weight.

[position of Table 1]

Cellular levels of GHRH-R mRNA in HL

GHRH-R mRNA levels were analyzed by RPA in the HL, as previously documented (33). Two distinct bands were detected using the RPR64 rGHRH-R probe and their sum was considered as total level of GHRH-R mRNA (33, 44). In the kidney of 2-month-old male rats (Fig. 1), the thin HL contained the highest level of GHRH-R mRNA. That found in the thick ascending HL and total medulla, were respectively 5.8 and 3.4 lower ($P<0.01$). GHRH-R mRNA levels were not significantly different in the thick ascending HL and total medulla.

[Position of Fig. 1]

Cellular localization of the GHRH-R in the thin HL

As the highest level of GHRH-R mRNA was observed in thin HL, purified cell preparations were used to assess the precise localization of the GHRH-R. Co-immunolocalization of the GHRH-R with markers of the thin descending (aquaporin-1) and ascending (CIC-k) HL demonstrated that immunoreactivity to aquaporin-1 (Fig. 2a) did not co-localized with that of GHRH-R (Fig. 2b) while immunoreactivity to CIC-k (Fig. 2d) co-localized with that of GHRH-R (Fig. 2e), with 91% of the GHRH-R fluorescent signal overlapping that of CIC-k. No signal was observed when the GHRH-R antibody was substituted by normal IgGs (Fig. 2g).

[Position of Fig. 2]

In vivo regulation of renal medulla GHRH-R mRNA levels following 2-, 7- and 14-days of 8%-NaCl dietary intake or a 3-day water deprivation.

After 2 days of high-NaCl dietary intake, medullary GHRH-R mRNA signals were 1.4 times lower ($P<0.01$) than those of control rats (0.3% NaCl), when expressed per 20 μg total RNA (Fig. 3A). When GHRH-R mRNA levels per medulla total RNA content was assessed (Fig. 3B), they were 1.5 times lower ($P<0.01$) in the medulla of rats fed a 8%-NaCl diet compared with those of controls.

[Position of Fig. 3]

However, after 7 days of a high-NaCl diet, GHRH-R mRNA signals were higher in comparison to controls (Fig. 4A). When expressed per 20 μ g total RNA, GHRH-R mRNA signals were 1.3 times higher ($P<0.05$) in the medulla compared with controls (0.3% NaCl) (Fig. 4B). When GHRH-R mRNA levels per medulla total RNA content were analyzed (Fig. 4C), they were 1.7 times higher ($P<0.01$) in the medulla of rats fed a high-NaCl diet compared with that of controls.

[Position of Fig. 4]

After 14 days of a high-NaCl diet, no significant difference could be observed between GHRH-R mRNA levels from rats fed a high-NaCl diet and controls either when expressed per 20 μ g total RNA or per medulla total RNA content (Fig. 5A, B).

[Position of Fig. 5]

After 3 days of water deprivation, no significant difference was observed between GHRH-R mRNA levels from water-deprived and control rats either when expressed per 20 μ g total RNA or per medulla total RNA content (Fig. 6A, B).

[Position of Fig. 6]

In vivo regulation of anterior pituitary GHRH-R mRNA levels following 2-, 7- and 14-days of 8%-NaCl dietary intake or a 3-day water deprivation.

GHRH-R mRNA levels were analyzed by Northern blotting in the anterior pituitary. The presence of \approx 2.5- and \approx 4-kb GHRH-R mRNA transcripts was detected in the gland of controls and rats fed a high-NaCl diet as previously reported (40). Levels of GHRH-R mRNA transcripts, expressed per 12 μ g total RNA (Figs. 7, 8, 9), showed several changes according to the length of the diet. After 2 days of high-NaCl dietary intake, levels of the 4-kb GHRH-R transcript were 1.3 times lower ($P < 0.05$) than controls. Levels of 2.5-kb transcript, combined levels of 2.5-kb and 4-kb transcripts and the 4-kb/2.5-kb ratio were similar in the anterior pituitary of rats fed a 8%-NaCl diet compared with those of controls when expressed per 12 μ g total RNA (Fig. 7A). When GHRH-R mRNA levels per anterior pituitary total RNA content were analyzed, no significant difference could be reached between groups (Fig. 7B).

[Position of Fig. 7]

After 7 days of high-NaCl diet, levels of 4-kd and 2.5-kb GHRH-R mRNA transcripts, when expressed per 12 μ g total RNA, were 1.5 times higher ($P < 0.05$) and 1.2 times lower ($P < 0.05$) in the anterior pituitary of rats fed a 8%-NaCl diet compared with controls, respectively. Combined levels of 2.5-kb and 4-kb transcripts were not affected by the diet. The 4-kb/2.5kb ratio was 1.9 times higher ($P < 0.05$) in the anterior pituitary of rats fed a high-NaCl diet compared with controls (Fig. 8A). When GHRH-R mRNA levels per anterior pituitary total RNA content was analyzed, the 4-kb transcript and the 4-kb/2.5-kb ratio were 1.7 times and 1.9 times higher ($P < 0.05$) in the anterior pituitary of rats fed a 8%-NaCl diet compared

with controls, respectively. The combined levels of 2.5-kb and 4-kb transcripts and that of the 2.5-kb transcript were not affected by the dietary intervention (Fig. 8B).

[Position of Fig. 8]

After 14 days of a high-NaCl dietary intake, no significant difference persisted among groups either when GHRH-R mRNA levels were expressed per 12 μ g total RNA or anterior pituitary total RNA content (Fig. 9A, B).

[Position of Fig. 9]

After 3 days of water deprivation, anterior pituitary levels of 2.5- and 4-kb GHRH-R mRNA transcripts, and their combined levels, increased 2.8, 3.4, 3.0 times ($P < 0.001$) when expressed per 12 μ g total RNA, respectively. The 4-kb/2.5-kb ratio remained unchanged (Fig. 10A). When GHRH-R mRNA levels per anterior pituitary total RNA content were analyzed, levels of the 2.5-kb and 4-kb transcripts as well as their combined levels did not reach a significance difference. The 4-kb/2.5-kb ratio was also unchanged (Fig. 10B).

[Position of Fig. 10]

DISCUSSION

Recently, Boisvert *et al.* reported the presence of a functional GHRH-R in rat semi-purified HL cells (33). These findings strengthen previous observations on the presence of GHRH-R mRNA in the rat renal medulla (45), GHRH-R immunoreactivity in total human kidney preparations (46) and GHRH binding sites in rat medullary homogenates (32). Moreover, they demonstrated the presence of a high level of medullary GHRH-R mRNA in HL but not in collecting duct (33). The present study extends these results in identifying, for the first time, the cell-specific localization of GHRH-R in the loop of Henle. Using preparations of purified thin and thick HL cells of rat renal medulla, a high level of GHRH-R mRNA was detected in the thin HL while a low level was found in the ascending thick HL. Because the thin HL cells contained a descending segment, participating to water transport, and an ascending segment, actively involved in ion exchanges, it was mandatory to assess the precise cellular localization of the GHRH-R in this portion of the nephron, to help defining putative biological roles. An immunocytochemical approach was used to co-localize GHRH-R with specific markers of the descending (aquaporin-1) (36) and ascending (ClC-k1) thin HL (37-38). The GHRH-R was highly co-localized with ClC-k1 but not with aquaporin-1, indicating a specific expression in the ascending thin HL.

To obtain additional information on roles of GHRH-R in ascending thin HL, the regulation of medullary GHRH-R mRNA levels was studied and compared with that in the anterior pituitary, using *in vivo* models of Na⁺/Cl⁻ or water homeostasis disruption, as obtained by a 8%-NaCl dietary supplementation for 2, 7 or 14 days

or a water deprivation for 3 days. The interest of performing such a comparison was supported by previous results showing a tissue-specific regulation of renal medulla and pituitary GHRH-R mRNA levels during development and aging (33). In the medulla, at the cellular level as determined using a fixed concentration of total RNA, GHRH-R mRNA was differentially regulated according to the duration of the NaCl-diet. A 2-, 7- or 14-day 8%-NaCl dietary intake decreased, increased or did not affect renal GHRH-R mRNA concentrations, respectively. The same type of profile was observed when GHRH-R mRNA was studied at the tissue level, as expressed by total medulla RNA content, suggesting that the dietary effect seen at the cellular level was not compensated from a physiological perspective. The effects seen after a 2- or 7-day 8%-NaCl diet were not mimicked by a 3-day water deprivation, suggesting that the GHRH-R may participate to adaptative processes in the ascending thin HL to compensate a loss of homeostasis caused by a sustained high-NaCl intake.

Comparison with anterior pituitary GHRH-R mRNA levels was performed by Northern blotting since this technique allows quantifying individual transcript concentration, their ratio and the total density GHRH-R mRNA levels. An increase of the 4-kb/2.5-kb ratio has previously been associated with changes in pituitary GHRH binding parameters (40, 47). This represents the first report on the effects of high NaCl dietary intake and water deprivation on GHRH-R mRNA levels. Contrarily to the renal medulla, a 2- or 7-day 8%-NaCl diet did not affect somatotroph total GHRH-R mRNA levels (2.5 kb + 4 kb), the exclusive cell type in the anterior pituitary expressing the GHRH-R (48). However, the 4-kb transcript decreased after 2 days of the 8%-NaCl diet, while the 2.5-kb transcript decreased and the 4-kb transcript and 4-kb/2.5-kb ratio increased after 7 days of the diet. A

similar profile was observed when GHRH-R mRNA was studied at the whole tissue level. Whether or not these changes may affect GHRH binding parameters will remain to be investigated. A 3-day water deprivation strongly increased cellular level of total GHRH-R mRNA level (2.5 kb + 4 kb) and individual level of 2.5- and 4-kb transcripts. In the whole anterior pituitary, levels of the 2.5-kb, 4-kb and combined levels of transcripts also increased but did not reach significance. This might be related to a reduction in the size of the anterior pituitary, directly or indirectly caused by water deprivation. Up-regulation of GHRH-R mRNA levels might be caused by increased circulating levels of vasopressin, which promote water reabsorption in water-deprived rats (49), and that could stimulate hypothalamic GHRH synthesis, by activating arcuate nucleus vasopressin binding sites (50). The regulation of GHRH-R expression by GHRH has been documented in anterior pituitary and semi-purified HL cells (33, 40, 51-57). An alternative explanation could be related to the food intake reduction of water-deprived rats. Since dietary protein restriction induces a significant down-regulation of hypothalamic preproGHRH mRNA (58), a compensatory mechanism could be proposed at the level of pituitary GHRH-R.

The present study, demonstrating that the renal GHRH-R is localized in the ascending thin HL cells and is specifically regulated by a high-NaCl diet but not a water deprivation, suggests a potential role of GHRH-R in ion transport. Because ClC-k1 is the major ion transporter of the thin ascending HL, a role of GHRH-R in chloride transport may be hypothesized. Of great interest, highest expression of medullary GHRH-R mRNA levels, between 30 and 70 days of age (33), coincides with a maturation of the ability to concentrate urine and an increased expression of

the chloride channel, CIC-k1, specific to the ascending thin limb of HL (59, 60). In these cells, the mechanism of action of ion transport involving the GHRH-R may resemble to that in somatotrophs. Kondo *et al.* have observed a suppression of chloride permeability in hamster ascending thin HL when intracellular calcium concentrations are reduced (61). This regulation appears to involve CIC-k1 as the rat form of this chloride transporter, expressed in *Xenopus* oocytes, is activated by extracellular calcium (62). As the activation of GHRH-R in the anterior pituitary causes a calcium entry (11-13), it may be suggested that the activation of medullary GHRH-R could increase the intracellular concentration of calcium and modulate chloride permeability of thin HL cells. A second mechanism could also be proposed. In the pituitary, activation of GHRH-R allows the stimulation of GH synthesis *via* the adenylate cyclase-PKA pathway (51), thus medullary GHRH-R could regulate chloride transport in ascending thin HL by affecting the expression of the chloride transporter, CIC-k1, *via* the same or an other signaling pathway. A similar phenomenon has been documented in the kidney where vasopressin increases the expression of aquaporin-2 in the collecting duct by activating an adenylate cyclase/PKA pathway (63).

In summary, the present study demonstrates, for the first time, the unique cellular localization of GHRH-R in the ascending thin HL, on ion transporter CIC-k1 positive cells. The regulation of GHRH-R mRNA levels by a high-NaCl diet, but not a water deprivation, allows to propose a potential biological role of the GHRH-R in this segment of HL in association with chloride transport.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr Kelly E Mayo (Department of Biochemistry, Molecular Biology and Cell Biology, Northwestern University, Evanston, IL) for providing us with the RPR-64 rGHRH-R cDNA and to Dr P Chartrand (CHUM Research Center, University of Montreal, Montreal, QC, CA) for giving us a GAPDH cDNA.

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research. CB and JS are recipients of a studentship from *Fonds de la Recherche en Santé du Québec* (FRSQ). JS was recipient of a summer studentship from *Association Diabète Québec*. CVD and PG are recipients of a post-doctoral fellowship and a scholarship chercheur-boursier national from FRSQ, respectively.

REFERENCES

1. Mayo KE 1992 Molecular cloning and expression of a pituitary specific receptor for growth hormone-releasing factor. *Mol Endocrinol* 6:1734-1744
2. Lin C, Lin SC, Chang CP, Rosenfeld MG 1992 Pit-1 dependent expression of the receptor for growth hormone-releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360:765-768
3. Hsiung HM, Smith DP, Zhang XY, Bennett T, Rosteck PR Jr, Lai MH 1993 Structure and functional expression of a complementary DNA for porcine growth hormone-releasing hormone receptor. *Neuropeptides* 25:1-10
4. Horikawa R, Gaylinn BD, Lyons Jr CE, Thorner MO 2001 Molecular cloning of ovine and bovine growth hormone-releasing hormone receptors: the ovine receptor is C-terminally truncated. *Endocrinology* 142:2660-2668
5. Tang J, Lagacé G, Castagné J, Collu R 1995 Identification of human growth hormone-releasing hormone receptor splicing variants. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2381-2387
6. Hashimoto K, Koga M, Motomura T, Kasayama S, Kouhara H, Ohnishi T, Arita N, Hayakawa T, Sato B, Kishimoto T 1995 Identification of alternatively spliced messenger ribonucleic acid encoding truncated growth hormone-releasing hormone receptor in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2933-2939
7. Gaylinn BD, Harrison JK, Zysk JR, Lyons CE, Lynch KR, Thorner MO 1993 Molecular cloning and expression of human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 7:77-84

8. Miller TL, Godfrey PA, Dealmeida VI, Mayo KE 1999 The rat growth hormone-releasing hormone receptor gene: structure, regulation, and generation of receptor isoforms with different signaling properties. *Endocrinology* 140:4152-4165
9. Tannenbaum GS, Ling N 1984 The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology* 115:1952-1957
10. Barinaga M, Bilezikjian LM, Vale WW, Rosenfeld MG, Evans RM 1985 Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 314:279-281
11. Lussier BT, French MB, Moore BC, Kraicer J 1991 Free intracellular Ca^{2+} concentration and growth hormone (GH) release from purified rat somatotrophs. III. Mechanism of action of GH-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 128:592-603
12. Lussier BT, French MB, Moore BC, Kraicer J 1991 Free intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and growth hormone release from purified rat somatotrophs. I. GH-releasing factor-induced Ca^{2+} influx raises $[\text{Ca}^{2+}]_i$. *Endocrinology* 128:570-582
13. Cuttler L, Glaum SR, Collins BA, Miller RJ 1992 Calcium signaling in single growth hormone-releasing factor-responsive pituitary cells. *Endocrinology* 130:945-953
14. Bilezikjian LM, Vale WW 1983 Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 113:1726-31

15. Chen C, Xu R, Clarke IJ, Ruan M, Loneragan K, Roh SG 2001 Diverse intracellular signaling systems used by growth hormone-releasing hormone in regulating voltage-gated Ca²⁺ or K channels in pituitary somatotropes. *Immunol Cell Biol* 2000 78: 356-368
16. Billestrup N, Swanson LW, Vale W 1986 Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6854-6857
17. Godfrey P, Rahal JO, Beamer WG, Copeland NG, Jenkins NA, Mayo KE 1993 GHRH receptor of little mice contains a missence mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nat Genet* 4:227-232
18. Lin SC, Lin CR, Gukovsky I, Lusic AJ, Sawchenko PE, Rosenfeld MG 1993 Molecular basis of the little mouse phenotype and implication for cell type-specific growth. *Nature* 364:208-213
19. Mayo KE, Hammer RE, Swanson LW, Brinster RL, Rosenfeld MG, Evans RM 1988 Dramatic pituitary hyperplasia in transgenic mice expressing a human growth hormone-releasing factor gene. *Mol Endocrinol* 2:606-612
20. Dean CE, Porter TE 1999 Regulation of somatotroph differentiation and growth hormone (GH) secretion by corticosterone and GH-releasing hormone during embryonic development. *Endocrinology* 140:1104-1110
21. Zeitler P, Siriwardana G. 2000 Stimulation of mitogen-activated protein kinase pathway in rat somatotrophs by growth hormone-releasing hormone. *Endocrine* 12:257-264
22. Pombo CM, Zalvide J, Gaylinn BD, Dieguez C 2000 Growth hormone-releasing hormone stimulates mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 141:2113-2119

23. Dickson PR, Feifel D, Vaccarino FJ 1995 Blockade of endogenous GRF at dark onset selectively suppresses protein intake. *Peptides* 16:7-9
24. Zhang J, Obal F Jr, Zheng T, Fang J, Taishi P, Krueger JM 1999 Intrapreoptic microinjection of GHRH or its antagonist alters sleep in rats. *J Neurosci.* 19:2187-2194
25. Guarcello V, Weigent DA, Blalock JE 1991 Growth hormone-releasing hormone receptors on thymocytes and splenocytes from rats. *Cell Immunol* 136:291-302
26. Bagnato A, Moretti C, Ohnishi J, Frajese G, Catt K 1992 Expression of the growth hormone-releasing hormone gene and its peptide product in the rat ovary. *Endocrinology* 130:1097-1102
27. Moretti C, Bagnato A, Solan N, Frajese G, Catt K 1990 Receptor-mediated actions of growth hormone-releasing factor on granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 127:2117-2126
28. Margioris AN, Brockmann G, Bohler HC Jr, Grino M, Vamvakopoulos N, Chrousos GP 1990 Expression and localization of growth hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid in rat placenta: in vitro secretion and regulation of its peptide product. *Endocrinology* 126:151-158
29. Hochberg Z, Bick T, Perlman R 1988 Two pathways of placental lactogen secretion by cultured human trophoblast. *Biochem Med Metab Biol* 39:111-116
30. Srivastava CH, Collard MW, Rothrock JK, Peredo MJ, Berry SA, Peskovitz OH 1993 Germ cell localization of testicular growth hormone-releasing hormone-like factor. *Endocrinology* 133:83-89

31. Ciampani T, Fabbri A, Isidori A, Dufau ML 1992 Growth hormone-releasing hormone is produced by rat Leydig cell in culture and acts as a positive regulator of Leydig cell function. *Endocrinology* 131:2785-2792
32. Boulanger L, Girard N, Strecko J, Gaudreau P 2002 Characterization of a growth hormone-releasing hormone binding site in the rat renal medulla. *Peptides* 23:43-50
33. Boisvert C, Pare C, Veyrat-Durebex C, Robert A, Dubuisson S, Morel G, Gaudreau P 2002 Localization and regulation of a functional GHRH receptor in the rat renal medulla. *Endocrinology* 143:1475-1484
34. Grupp C, Lottermoser J, Cohen DI, Begher M, Franz HE, Müller GA 1997 Transformation of rat inner medullary fibroblasts to myofibroblasts in vitro. *Kidney Int* 52:1279-1290
35. Trinh-Trang-Tan MM, Bouby N, Coutaud C, Bankir L 1986 Quick isolation of rat medullary ascending limbs. *Pflügers Arch* 407:228-234
36. Nielsen S, Pallone T, Smith BL, Christensen EI, Agre P, Maunsbach AB 1995 Aquaporin-1 water channels in short and long loop descending thin limbs and in descending vasa recta in rat kidney. *Am J Physiol* 268:F1023-1037
37. Uchida S, Sasaki S, Nitta K, Uchida K, Horita S, Nihei H, Marumo F 1995 Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, ClC-K1. *J Clin Invest* 95:104-113
38. Yoshikawa M, Uchida S, Yamauchi A, Miyai A, Tanaka Y, Sasaki S, Marumo F 1999 Localization of rat ClC-K2 chloride channel mRNA in the kidney. *Am J Physiol* 276:F552-558

39. Boulanger L, Andersen PH, Gaudreau P 1999 Development of a site-directed polyclonal antibody against the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its use to estimate GHRH receptor concentration in normal and hypothyroid rats. *Neuroendocrinology* 70:117-127
40. Girard N, Boulanger L, Denis S, Gaudreau P 1999 Differential in vivo regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor by GHRH in young and aged rats. *Endocrinology* 140:2836-2842
41. Ying WZ, Sanders PW 1998 Dietary salt enhances glomerular endothelial nitric oxide synthase through TGF-beta1. *Am J Physiol* 275:F18-F24
42. Ying WZ, Sanders PW 1998 Dietary salt regulates expression of Tamm-Horsfall glycoprotein in rats. *Kidney Int* 54:1150-1156
43. Shin SJ, Wen JD, Chen I H, Lai FJ, Hsieh MC, Hsieh TJ, Tan MS, Tsai JH 1998 Increased renal ANP synthesis, but decreased or unchanged cardiac ANP synthesis in water-deprived and salt-restricted rats. *Kidney Int* 54:1617-1625
44. Korytko AI, Zeitler P, Cuttler L 1996 Developmental regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression in the rat. *Endocrinology* 137:1326-31
45. Matsubara S, Sato M, Mizobuchi M, Niimi M, Takahara J 1995 Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology* 136:4147-4150
46. Fujinaka Y, Yokogoshi Y, Zhang CY, Okura T, Kitagawa K, Saito S 1996 Tissue-specific molecular heterogeneity of human growth hormone-releasing hormone receptor protein. *FEBS Lett* 394:1-4

47. Robinette K, Robert A, Boisvert C, Paré C, Ferland G, Gaudreau P, Tissue-specific regulation of growth hormone-releasing hormone receptor in the aging rat: effects of long-term caloric and protein restriction. Peptide receptor 2001 International Symposium, 2001 (Abstract p121)
48. Morel G, Gallego R, Boulanger L, Pintos E, Garcia-Caballero T, Gaudreau P 1999 Restricted presence of the growth hormone-releasing hormone receptor to somatotropes in rat and human pituitaries. *Neuroendocrinology* 70:128-136
49. Robertson GL 1983 Thirst and vasopressin function in normal and disordered states of water balance. *J Lab Clin Med* 101:351-371
50. Tribollet E, Arsenijevic Y, Barberis C 1998 Vasopressin binding sites in the central nervous system: distribution and regulation. *Prog Brain Res* 119:45-55
51. Horikawa R, Hellmann P, Cella SG, Torsello A, Day RN, Muller EE, Thorner MO 1996 Growth hormone-releasing factor (GRF) regulates expression of its own receptor. *Endocrinology* 137:2642-2645
52. Cella SG, Locatelli V, Mennini T, Zanini A, Bendotti C, Forloni GL, Fumagalli G, Arce VM, de GC V, Wehrenberg WB 1990 Deprivation of growth hormone-releasing hormone early in the rat's neonatal life permanently affects somatotropic function. *Endocrinology* 127:1625-1634
53. Miki N, Ono M, Murata Y, Ohsaki E, Tamitsu K, Yamada M, Demura H 1996 Regulation of pituitary growth hormone-releasing factor (GRF) receptor gene expression by GRF. *Biochem Biophys Res Commun* 224:586-590

54. Bilezikjian LM, Seifert H, Vale W 1986 Desensitization to growth hormone-releasing factor (GRF) is associated with down-regulation of GRF-binding sites. *Endocrinology* 118:2045-2052
55. Aleppo G, Moskal SF, De Grandis PA, Kineman RD, Frohman LA 1997 Homologous down-regulation of growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 138:1058-1065
56. Lasko CM, Korytko AI, Wehrenberg WB, Cuttler L 2001 Differential GH-releasing hormone regulation of GHRH receptor mRNA expression in the rat pituitary. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E626-E631
57. Hansen BS, Gerlach LO, Hansen A, Foged C, Andersen PH 2001 The growth hormone-releasing hormone receptor: desensitisation following short-term agonist exposure. *Pharmacol Toxicol* 88:81-88
58. Bruno FH, Sing J, Berelowitz M 1991 Regulation of rat hypothalamic preprogrowth hormone-releasing factor messenger ribonucleic acid by dietary protein. *Endocrinology* 129:1226-1232
59. Yasui M, Marples D, Belusa R, Eklof AC, Celsi G, Nielsen S, Aperia A 1996 Development of urinary concentrating capacity: role of aquaporin-2. *Am J Physiol* 271:F461-F468
60. Kobayashi K, Uchida S, Mizutani S, Sasaki S, Marumo F 2001 Developmental expression of CLC-K1 in the postnatal rat kidney. *Histochem Cell Biol* 116:49-56
61. Kondo Y, Yoshitomi K, Imai M 1998 Effect of Ca²⁺ on Cl⁻ transport in thin ascending Henle's loop. *Am J Physiol* 254:F232-F239
62. Waldegger S, Jentsch TJ 2000 Functional and structural analysis of ClC-K chloride channels involved in renal disease. *J Biol Chem* 275:24527-24533

63. Marples D, Frokiaer J, Nielsen S 1999 Long-term regulation of aquaporins in the kidney. *Am J Physiol* 276:F331-F339

TABLE 1. Physiological parameters of rats following a 2-, 7-, or 14-day high-salt diet or a 3-day water-deprivation.

	Control	High-salt	Control	High-salt	Control	High-salt	Control	High-salt	Water deprivation
Duration (day)	2	2	7	7	14	14	3	3	3
Number of animals	8	7	8	8	8	8	8	8	9
Body weight (g)	264±5	266±3	323±11	315±14	382±5	354±7	242±2	172±2 ^a	
Food intake (g/day)	25±2	23±1	25±1	26±1	25±1	27±2	22±2	8±2 ^b	
Water intake (mL/day)	26±2	89±6 ^a	32±4	109±7 ^a	41±2	116±7 ^a	34±2	0	
Urine flow rate (ml/day/100 g bw)	5.5±0.7	29.8±2.5 ^a	4.0±0.9	26.5±1.6 ^a	5.4±0.8	25.9±1.8 ^a	ND	ND	
Urine _{Na} rate (mmole/day/L)	ND	ND	57.6±7.0	>300 ^a	ND	ND	ND	ND	

Values are means ± SEM of the data compiled at the end of the study.

High-salt, 8% NaCl diet. Control, 0.3% NaCl diet. ND, not determined.

^a*P*<0.0001, compared to the data obtained from control. ^b*P*<0.001, compared to the data obtained from control.

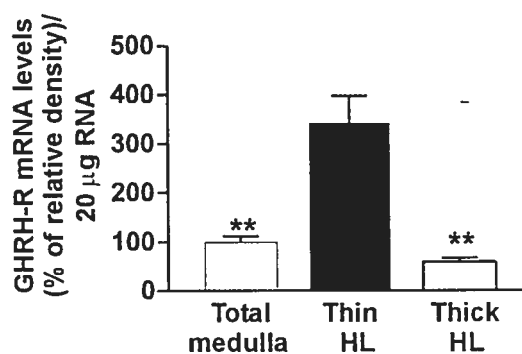


Fig. 1. GHRH-R mRNA levels in total medulla and purified thin and thick HL. An average of 24 medullas and 26 inner stripes of outer medulla from 2-month-old male rats were pooled for each purification of thin and thick HL, respectively. Twenty (thin HL) and 20 µg (thick HL and medulla) of total RNA were analyzed by RPA. Results were expressed in percentage of relative density to that obtained in the thin HL and represent the mean \pm SEM of two independent experiments performed in duplicate.

** $P < 0.01$ when compared with GHRH-R mRNA levels in thin HL (Dunnett's test).

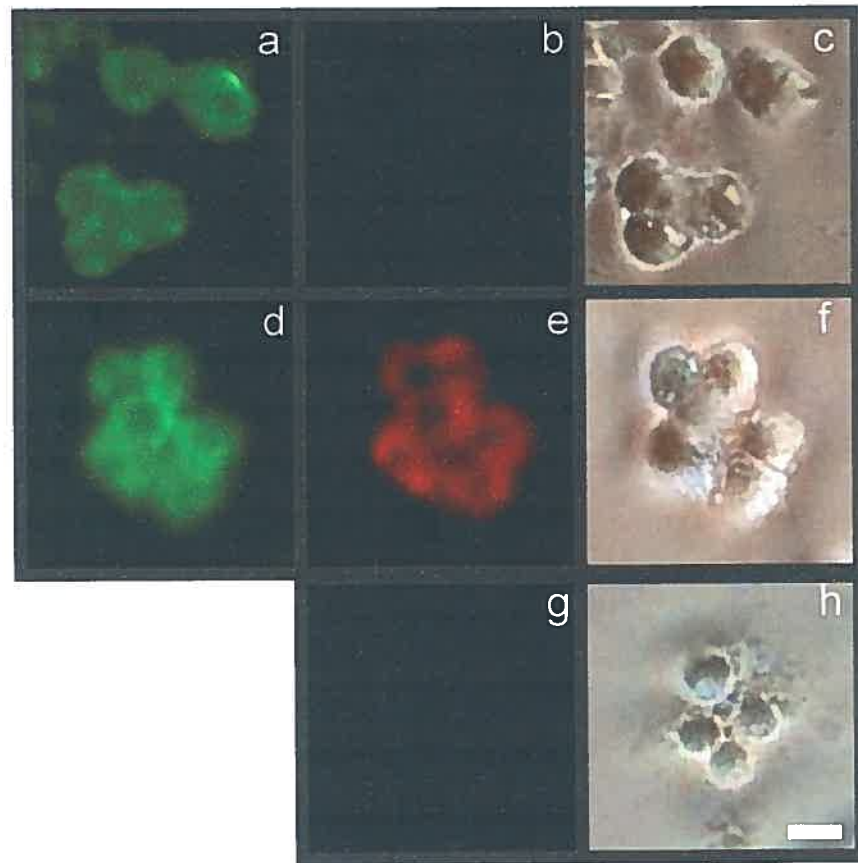


Fig. 2. Immunological localization of the GHRH-R in thin HL cells using the anti-GHRH-R(392-404) antibody. Co-localization of GHRH-R immunoreactivity (b, e) was assessed in HL cells from 2-month-old male rats using an anti-aquaporin-1 antibody, as a marker of the thin descending HL (a) and an anti-CIC-k antibody, as a marker of the thin ascending HL (d). Phase contrast are shown in c, f and h. The specificity of labeling was assessed by substituting the anti-GHRH-R(392-404) polyclonal antibody with normal IgGs (g). Bar, 10 μ m. Results are representative of three independent experiments.

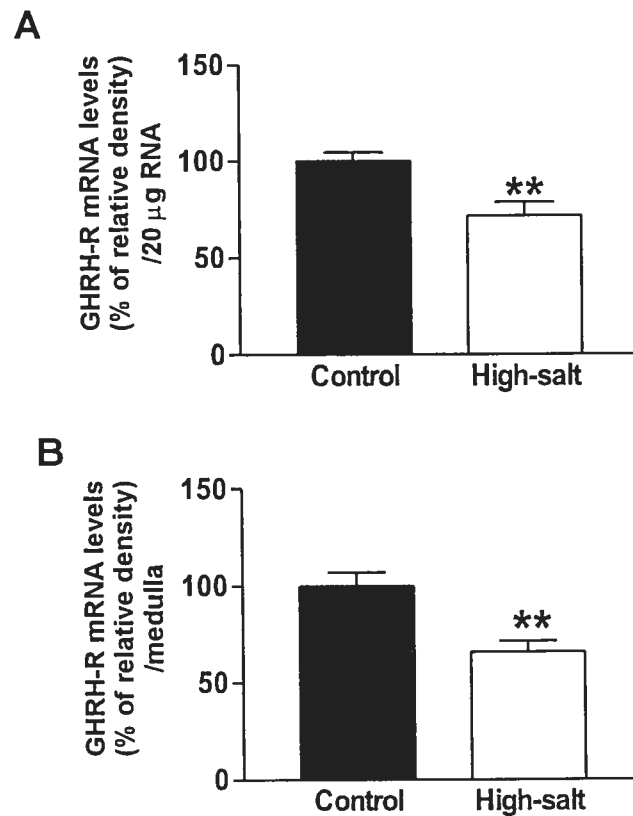


Fig. 3. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla following two days of high-NaCl dietary intake. Six and 5 rats were used in control and high-NaCl groups, respectively. Twenty μg of total RNA was analyzed by RPA for each group. A and B, GHRH-R mRNA levels expressed per 20 μg total RNA (A) or per medulla total mRNA content (B) as a percentage of relative density to that obtained in the medulla from control rats. Results represent the mean \pm SEM of 2 independent experiments performed in triplicate.

** $P < 0.01$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the medulla from control rats (Student's t test).

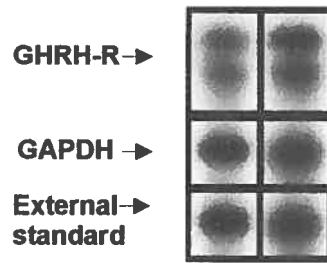
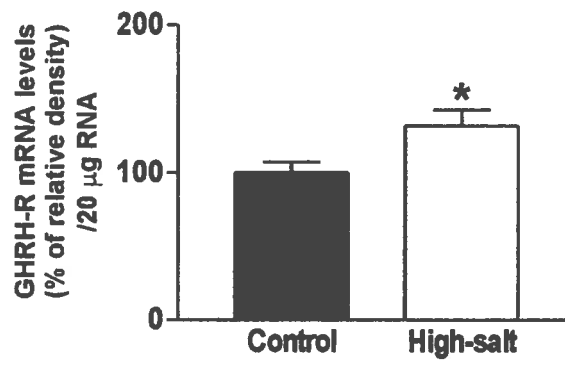
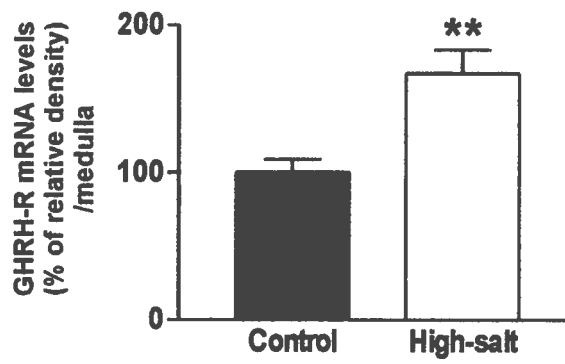
A**B****C**

Fig. 4. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla following seven days of high-NaCl dietary intake. Eight rats were used in each group. Twenty μg of total RNA was analyzed by RPA for each group. A, Autoradiographic representation of GHRH-R mRNA, GAPDH mRNA and RPR-64 *Msc I* RNA standard (40 pg) signals, in each group. B and C, GHRH-R mRNA levels expressed per 20 μg total RNA (B) or per medulla total RNA content, as a percentage of relative density to that obtained in the medulla from control rats. Results represent the mean \pm SEM of 2 independent experiments performed in triplicate.

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the medulla from control rats (Student's *t* test).

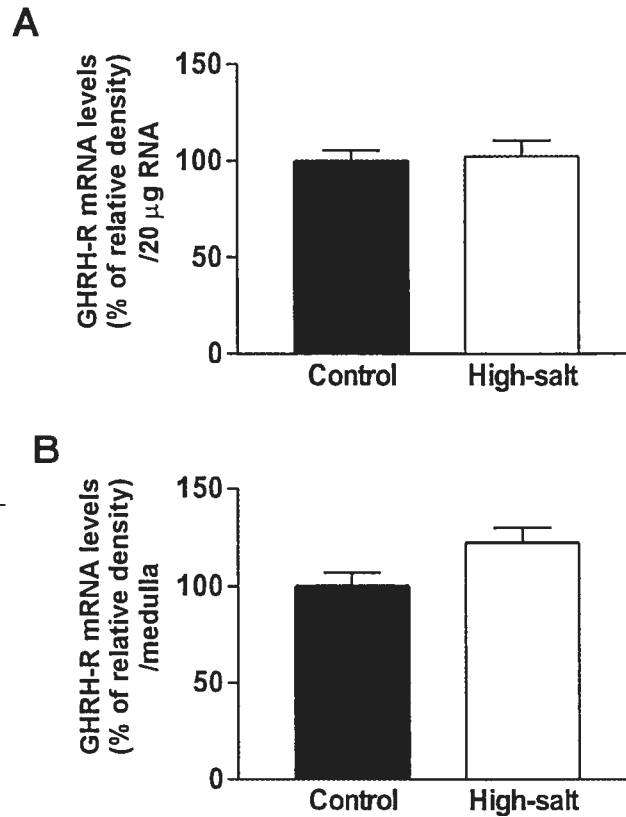


Fig. 5. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla following fourteen days of high-NaCl dietary intake. Seven rats were used in each group. Twenty μ g of total RNA was analyzed by RPA for each group. A and B, GHRH-R mRNA levels expressed per 20 μ g total RNA (A) or per medulla total mRNA content (B) as a percentage of relative density to that obtained in the medulla from control rats. Results represent the mean \pm SEM of 2 independent experiments performed in triplicate.

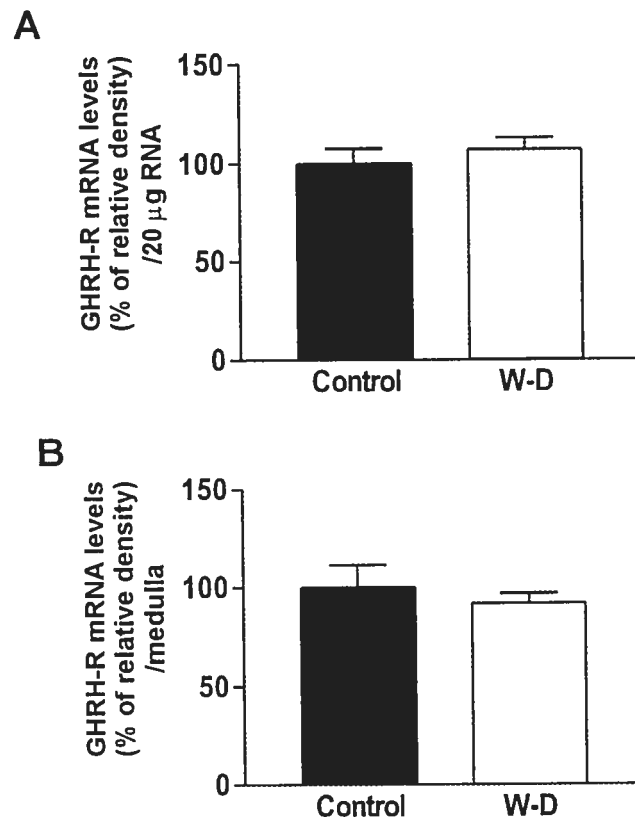


Fig. 6. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla following three days of water deprivation. Seven and 9 rats were used in control and water-deprived groups, respectively. Twenty μg of total RNA was analyzed by RPA for each group. A and B, GHRH-R mRNA levels expressed per 20 μg total RNA (A) or per medulla total mRNA content (B) as a percentage of relative density to that obtained in the medulla from control rats. Results represent the mean \pm SEM of 2 independent experiments performed in triplicate. W-D: water-deprived.

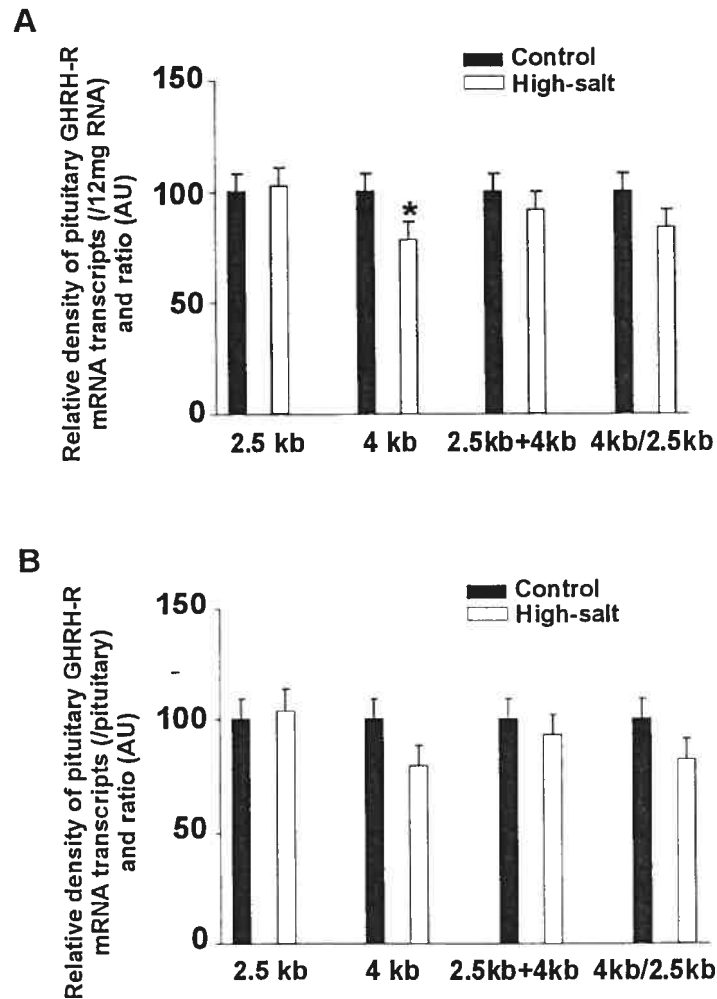


Fig. 7. GHRH-R mRNA levels in the pituitary following two days of high-NaCl dietary intake. Seven and 8 rats were used in control and high-NaCl groups, respectively. Twelve μg of total RNA were analyzed by Northern blot for each group. A and B, GHRH-R mRNA levels expressed per 12 μg total RNA (A) or per pituitary total mRNA content (B) as a percentage of relative density to that obtained in the pituitary from control rats. Results represent the mean \pm SEM of an experiment performed in singulate.

* $P < 0.05$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the pituitary from control rats (Student's t test).

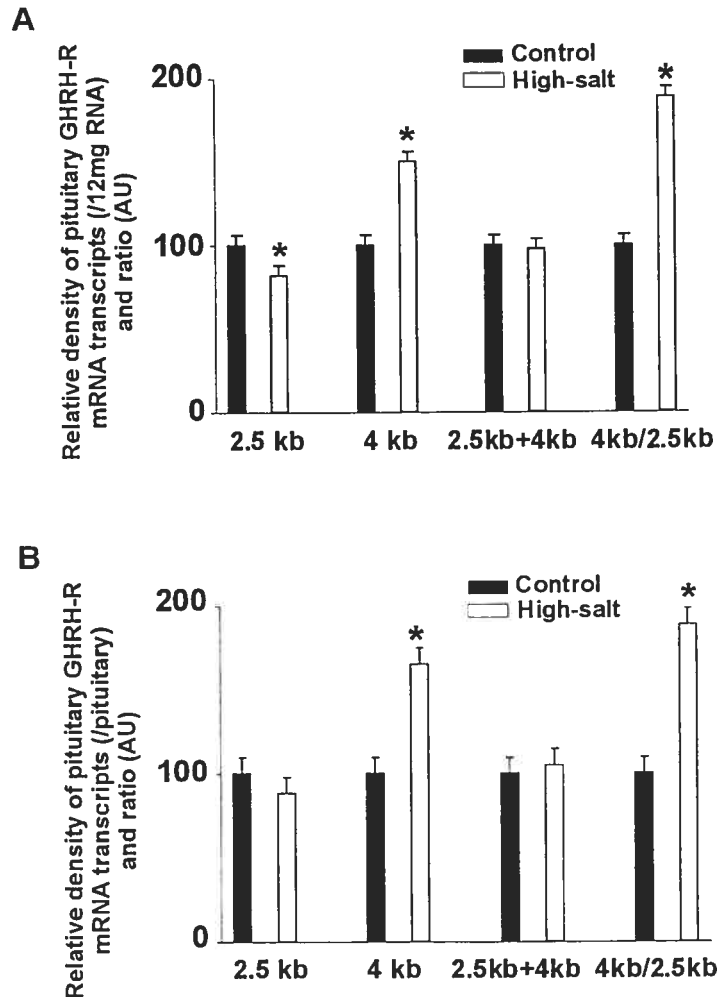


Fig. 8. GHRH-R mRNA levels in the pituitary following seven days of high-NaCl dietary intake. Eight rats were used in each group. Twelve μg of total RNA were analyzed by Northern blot for each group. A and B, GHRH-R mRNA levels expressed per 12 μg total RNA (A) or per pituitary total mRNA content (B) as a percentage of relative density to that obtained in the pituitary from control rats. Results represent the mean \pm SEM of an experiment performed in singulate $*P < 0.05$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the pituitary from control rats (Student's t test).

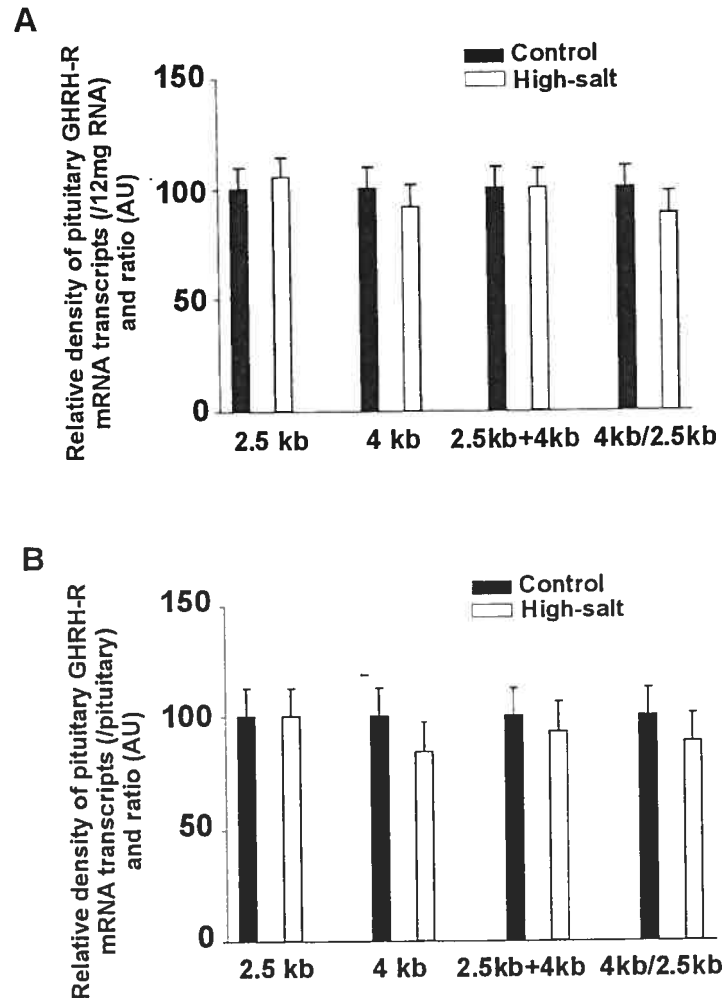


Fig. 9. GHRH-R mRNA levels in the pituitary following fourteen days of high-NaCl dietary intake. Eight rats were used in each group. Twelve μg of total RNA were analyzed by Northern blot for each group. A and B, GHRH-R mRNA levels expressed per 12 μg total RNA (A) or per pituitary total mRNA content (B) as a percentage of relative density to that obtained in the pituitary from control rats. Results represent the mean \pm SEM of an experiment performed in singulate.

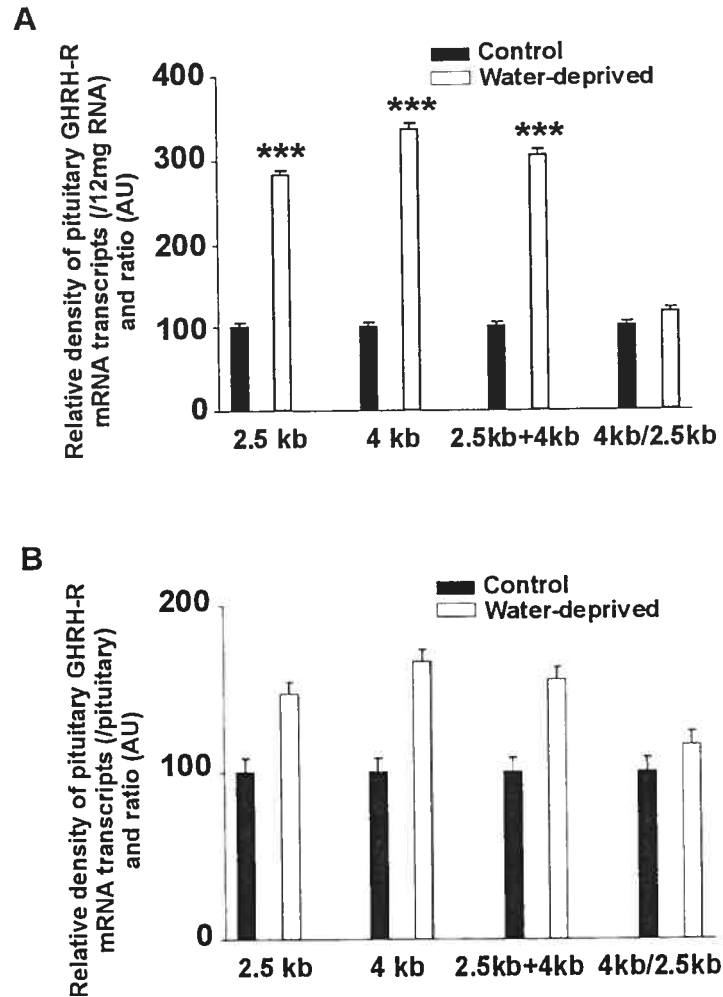


Fig. 10. GHRH-R mRNA levels in the pituitary following three days of water deprivation. Three and 6 rats were used in control and water-deprived groups, respectively. Twelve μg of total RNA were analyzed by Northern blot for each group. A and B, GHRH-R mRNA levels expressed per 12 μg total RNA (A) or per pituitary total mRNA content (B) as a percentage of relative density to that obtained in the pituitary from control rats. Results represent the mean \pm SEM of an experiment performed in singulate.

*** $P < 0.001$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the pituitary from control rats (Student's t test).

Tissue-specific regulation of pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor mRNA levels in type-I diabetic rats

Julie Strecko, Chantale Boisvert, Alma Robert and Pierrette Gaudreau

Laboratory of Neuroendocrinology of aging, CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital and Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence and request for reprints should be addressed to:

Dr Pierrette Gaudreau, Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital, Room M-5226, 1560 east Sherbrooke street, Montreal, Quebec, Canada, H2L 4M1.

Tel: (514) 890-8000 extension 27159

Fax: (514) 412-7661

E-mail: [REDACTED]

Running title: Regulation of GHRH receptor in the diabetic rat.

Key words: growth hormone-releasing hormone, GHRH receptor, mRNA, renal medulla, anterior pituitary, diabetes, streptozotocin

Titre de l'article: Tissue-specific regulation of pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor mRNA levels in the streptozotocin-diabetic rat. soumis à "Endocrinology"

Auteurs: Strecko J, Boisvert C, Robert A, Gaudreau P.

Participation: Les travaux décrits dans ce manuscrit ont été effectués principalement par Julie strecko. Chantale Boisvert a participé à la mise au point de l'essais de protection à la RNase, à l'analyse des échantillons et des données et à la rédaction du manuscrit. Pierrette Gaudreau a supervisé les étapes de réalisation de l'étude et de rédaction de l'article.


Julie Strecko


Chantale Boisvert


Alma Robert


Pierrette Gaudreau

ACCORD DES COAUTEURS

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme


Chantale Boisvert
BCM, Biochimie

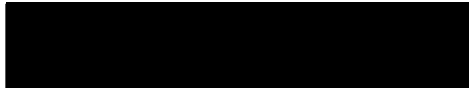
2. Description de l'article

Strecko J, **Boisvert C**, Robert A, Gaudreau P. Tissue-specific regulation of pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor mRNA levels in the streptozotocin-diabetic rat. soumis à "Endocrinology"

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Chantale Boisvert** inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Localisation, régulation et fonction du récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat".

 _____ 28-01-03
Coauteur Signature Date

 _____ 28/01/03
Coauteur Signature Date

 _____ 28/01/03
Coauteur Signature Date

ABSTRACT

In diabetic rats, perturbations of pituitary and renal GH/IGF-I systems affect GH secretion and possibly cell proliferation. As no data exist on the effect of diabetes on the anterior pituitary and renal medulla GHRH receptor (GHRH-R), the present study was aimed at determining GHRH-R mRNA levels in these tissues by Northern blotting and RPA, respectively, using streptozotocin (STZ)-diabetic rats. GHRH-R mRNA transcript levels showed several disturbances according to the length and severity of diabetes. In the pituitary, combined levels of 2.5- and 4-kb transcripts increased 1.5-1.8 times, 2-21 days post-STZ, but were unchanged 60 days post-STZ. The 4/2.5-kb transcript ratio was not modified 2 days post-STZ, but increased 2.2 and 1.7 times, 21-60 days post-STZ. As the pituitary decreased in size with the duration of diabetes, no tissue compensation could counteract the deleterious changes occurring at cellular level. In the medulla, GHRH-R mRNA levels decreased 2.2, 1.3 and 1.4 times, 2, 21 and 60 days post-STZ. In spite of an increase in kidney size, no important compensatory effect allowed a normalization of GHRH-R mRNA. These results indicate a tissue-specific regulation of GHRH-R mRNA levels in diabetes and suggest a role for this peptidergic system in the progression of the disease.

INTRODUCTION

In somatotroph cells, binding of hypothalamic growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) to its specific G-protein-coupled plasma membrane receptor (GPCR) (1-4) stimulates the accumulation of intracellular cAMP (5), leading to GH secretion (6, 7) and synthesis (7), and somatotroph proliferation and differentiation (8-11). Recent data suggest that in addition to protein kinase A (PKA) (12, 13), PKC (13) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) (14) pathways are activated by GHRH.

The GHRH receptor (GHRH-R) has been cloned in rat (4, 15), mouse (15), porcine (16), bovine (17), ovine (17) and human pituitaries (4, 18, 19) and in human pituitary adenomas (18-20). It belongs to the subfamily B-III of GPCR, which also includes receptors for VIP, secretin, glucagon, GIP, PTH, calcitonin, CRF and PACAP (4). In rat and mouse pituitaries, the presence of 2-2.5-kb and 3.1-4 kb-GHRH-R mRNA transcripts has been reported (4, 15). While the short transcript likely generates the 423 amino acid functional GHRH-R (21), structural elucidation of the 4-kb transcript has so far been unsuccessful. Nonetheless, correlative evidence suggest that GHRH-R entities mediating high and low affinity GHRH binding may originate from the 2.5 and the 4.0 kb GHRH-R mRNA transcript, respectively (25). At the protein level, GHRH-R variants with either a longer third intracytoplasmic loop than the 423 aa receptor (4) or a modified C-terminus (22), have been identified in rat pituitary. They retain a similar affinity to GHRH but may exhibit different abilities to mediate GHRH-induced cAMP production (21, 22). In extrapituitary rat tissues, such as brain, heart, lung,

duodenum, small intestine, spleen, kidney, epididymis and skeletal muscle, but not liver, low concentrations of GHRH and GHRH-R mRNA have been detected by reverse transcription ((RT)-PCR) (23). However, the kidney represents the sole organ containing a sufficient concentration of GHRH-R mRNA to allow its detection without amplification (23). Recently, the presence of a functional GHRH-R has been reported in the loop of Henle of the rat renal medulla (24). Pituitary and renal GHRH-R mRNA levels are regulated in a complex fashion by to the physiological and hormonal status (24-29).

Among the various pathologies affecting GH secretion, diabetes has been shown to induce several disturbances of the somatotroph axis. In animal models of diabetes, pituitary GH secretion is decreased (30-33). This has been related, at least in part, to a marked reduction of hypothalamic preproGHRH mRNA levels 17 to 60 days post-STZ administration (34, 35). A time-course study in streptozotocin (STZ)-diabetic rats has however shown that hypothalamic GHRH content is increased 2 to 4 days post-STZ administration but returns to normal values after 7 days and decreased thereafter (36). In this study, pituitary and serum GH levels as well as serum IGF-I contents of diabetic rats decreased over time (36). In STZ-diabetic rats, the renal GH/IGF-I axis is also affected. Total kidney GH receptor (GH-R) mRNA levels were unchanged (37, 38) while IGF-I mRNA levels increased 1 to 2 days post-STZ administration (39) and returned to normal or decreased on day 4 (38, 39). Medullary GH-R, IGF-I and IGF-I receptor mRNA and protein levels were found to be normal 7 days post-STZ administration (40), although a transient increase of medullary IGF-I immunoreactivity has been reported (41). In ascending thick limb cells of the loop of Henle of STZ rats, including damaged and vacuolated

cells, IGF-I immunoreactivity was shown to be increased (42).

The anterior pituitary and renal medulla GHRH-R may be affected during the evolution of diabetes and this may contribute in regulating GH secretion and likely cell proliferation. Therefore, the aim of the present study was to assess GHRH-R mRNA levels in these two tissues, 2, 21 and 60 days post-streptozotocin (STZ) administration.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and drug administration

Two month-old male Sprague Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Canada), weighing 175-225g, were housed in constant temperature- (22 C), humidity- (65%) and lighting- (12 h cycles; lights on at 0700 h) controlled rooms and had free access to food and water. Animals were acclimatized 3-6 days to the animal facilities and metabolic cages before diabetes induction. For the short-term study, they were housed individually in metabolic cages for its entire duration. For the long-term study, they were maintained in metabolic cages for the first two weeks and subsequently one-day per week. They were otherwise housed individually in plastic cages. Rats were assigned to each group randomly. BW, food and water intakes and urine volume were analyzed before STZ administration to insure that control and treated groups were identical. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ; Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, Canada), freshly dissolved in 0.5 ml citrate buffer, pH 4.5 (Sigma-Aldrich Canada) (35). Recommended dosage of 100 and 65 mg/kg BW for the short- (2 and 21days) and long-term studies (60 days), respectively, were taken from a recent publication of Busiguina et al. (35), to enable correlation of our results with their data. Moreover this ip dose-range was shown to cause no renal toxicity (37, 43). Control rats were injected with 0.5 ml of the citrate buffer vehicle in each experimental protocol. BW, food and water intakes and urine volume were recorded every day during the short-term studies and every three days of the first two weeks of the long-term study and once a week thereafter. Urine analyses were performed on 24-h samples, using Petstix 8 (Bayer Inc, Toronto, Canada).

Diabetes was defined by the appearance of glucosuria (≥ 1000 mg/dL) and polyuria (≈ 80 ml/24 h) within 24h (short-term) or 24-72h (long-term).

Tissue handling

Two, 21 or 60 days post-STZ administration, rats were sacrificed in a block-design fashion, between 0900-1130 h, by rapid decapitation. Trunk blood was collected and blood glucose analyzed with a Glucometer Elite (Bayer Inc). Kidneys, pituitaries and livers were excised, wet weight of left kidney was taken and the anterior pituitary and renal medullas rapidly dissected out. Macroscopic evaluation of anterior pituitaries revealed an important reduction of their size, 21 and 60 days post-STZ administration, in comparison to controls ($\approx 50\%$, based on macroscopic evaluation; 55-60%, based on total RNA content). All tissues were immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 C until RNA extraction (right medulla) or processing for medullary IGF-I extraction (left medulla). The animal protocol was approved by the Animal Care Committee of our institution in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Northern blot hybridization

Total RNA was isolated from each anterior pituitary using a single step acid guanidium-phenol/chloroform procedure with TRIzol (Invitrogen/Canada Life Technologies, Burlington, Canada). Aliquots of 12 μ g total RNA were denatured by heating (65 C, 10 min) in a 50% formamide/17.5% formaldehyde/15 mM MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) buffer (pH 7.0), containing 5 mM sodium acetate and 1 mM EDTA. They were subjected to electrophoresis on 1.2% agarose gels containing 17.5% formaldehyde, using a 33 mM MOPS buffer. RNA

was transferred by capillary elution to a nylon membrane (Hybond-NX, Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Canada) and covalently attached by UV cross-linking (Stratagene, La Jolla, CA) and heating (80 C, 2 h). Prehybridization was performed in Robbins' hybridization solution (7% SDS containing 0.25 M Na₂HPO₄ (pH 7.4), 1 mM EDTA (pH 8.0) and 1% bovine serum albumin) at 65 C, 2 h. Blots were hybridized with the RPR64 cDNA probe corresponding to the 3' segment of the rat GHRH-R cDNA (nucleotide position, 1044-1611; accession number, NM_012850) (4). It was labeled with α -[³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech), using random hexamer primers and the Klenow fragment of *E coli* DNA polymerase (Invitrogen/Canadian Life Technologies) and purified by chromatography, using a G-50 column (Amersham Pharmacia Biotech). Hybridization was performed in fresh Robbins' solution at 65 C, overnight, in presence of 10X10⁶cpm [³²P]RPR64/ml of solution. Membranes were subsequently washed (2XSSC (standard saline citrate (SSC) (1X SSC: 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate), pH 7.0)/0.1% SDS, 23 C, 2x10 min; 1XSSC/0.1% SDS, 65 C, 1-2x10 min; 0.5XSSC/0.1% SDS, 65 C, 1-2x10 min) and exposed to Biomax MS-1 films (Eastman Kodak, Rochester, NY) at -80 C with an intensifying screen. Membranes were then stripped in a boiling aqueous solution of 0.1% SDS (60 min) and sequentially rehybridized with rat GAPDH and 28S rRNA probes (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Amounts of GHRH-R mRNA were normalized in each lane with glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH, after assessing the stability of this mRNA compared with 28S rRNA, in the experimental conditions of diabetes, as previously described (25). Quantification of each GHRH-R mRNA transcripts (2.5 and 4 kb), GAPDH mRNA and 28S rRNA levels was performed by densitometry, using an IS1000 digital

imaging system (Alpha Innotech Corp/Canberra Packard, Montreal, Canada). The intra-assay coefficient of variation of normalized GHRH-R mRNA signals was \leq 10% in all experiments. Specificity of the [32 P]RPR64 cDNA probe was assessed in each experiment using a negative control (12 μ g of liver total RNA). In addition, linearity of protected signals was verified in each experiment using 6-18 μ g of pituitary total RNA from 2-month-old rats. Results were expressed in percentage of relative density to those of control groups, using a fixed amount of total RNA. Results were also expressed as total GHRH-R mRNA relative densities per anterior pituitary total RNA content.

Ribonuclease protection assay

Total RNA was isolated from right renal medullas using a single step acid guanidinium-phenol/chloroform method with TRIzol (Invitrogen/Canada Life Technologies). Medullary GHRH-R mRNA levels were assessed using the RPR64 probe (24). The antisense GHRH-R [32 P]-labeled riboprobe was generated by *in vitro* transcription of the BamH I-linearized RPR64-pGEM3z plasmid, using T7 RNA polymerase (MAXIscript transcription kit, Ambion, Austin, TX), in the presence of α -[32 P]UTP (800 mCi/mmol; Amersham Pharmacia Biotech). GAPDH mRNA levels were determined, using a probe spanning the region of exons 5-8 of the rat GAPDH cDNA (nucleotide position, 369-685). The antisense-labeled probe was generated by *in vitro* transcription of the Xba I-linearized p-TRI-GAPDH plasmid (Ambion), using T7 RNA polymerase. The riboprobes were purified on 5% denaturing polyacrylamide gel and eluted using the buffer supplied with the ribonuclease protection assay (RPA) kit (Ambion). The specific activity of the RPR64 and GAPDH riboprobes were determined after trichloroacetic acid

precipitation onto GF/B Whatman filters (Fisher Scientific Ltd, Montreal, Canada), and were $424 \pm 87 \times 10^6$ cpm/ μ g RNA and $2.8 \pm 0.9 \times 10^6$ cpm/ μ g RNA, respectively. RPA was performed using the RPA II kit (Ambion). Twenty μ g total RNA from renal medulla were hybridized overnight at 50 C, after denaturation at 95 C for 3 min, with 1 pM [32 P]GHRH-R and 1 pM [32 P]GAPDH riboprobes. To normalize GHRH-R mRNA levels for experimental variations, 40 pg of an external standard, originating from the *in vitro* transcription of the sense sequence (nucleotide position, 1044-1203) of RPR64 cDNA, were added to each RNA sample before hybridization. GAPDH was used as internal standard. Nonannealed nucleic acids were digested with RNase A (1 U/ml) and RNase T (40 U/ml) at 37 C for 30 min. Stable hybrids were resolved on 1.5 mm 5% polyacrylamide-8 M urea denaturing gels. Autoradiography was performed at -80°C using Biomax MS-1 films (Eastman Kodak) and an intensifying screen. Medullary GHRH-R and GAPDH mRNA and cRNA external standard levels were quantified by densitometry, using an IS1000 digital imaging system (Alpha Innotech Corp/Canberra Packard). The intra-assay coefficient of variation of normalized GHRH-R mRNA levels was $\leq 10\%$ in all experiments. Specificity of the [32 P]RPR64 riboprobe was assessed in each experiment using positive (5 μ g pituitary total RNA) and negative (20 μ g of liver total RNA) controls. In addition, the linearity of protected signals was verified in each experiment, using 10-30 μ g of total medulla RNA from 2-month-old rats. Results were expressed in percentage of relative density to those of control group, using a fixed amount of total RNA. Results were also expressed as total GHRH-R mRNA relative densities per renal medulla total RNA content.

Statistical analysis

Results were expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between control and diabetic groups were performed by the unpaired Student's *t* test. Statistical significance of differences was established at $P < 0.05$.

RESULTS

Characteristics of diabetic rats

As shown in Table 1, body weight (BW) loss, hyperglycemia (>600 mg/dL), hyperglucosuria (>2000 mg/dL) and polyuria characterized short- and long-term diabetic states. Two days post-STZ administration, few rats exhibited ketoneuria (40 mg/dL), however 21 and 60 days post-STZ, urine ketone levels were superior to 60 mg/dL in all diabetic rats (data not shown). BW from diabetic rats were decreased 1.1, 1.5 and 1.7 times, 2, 21 and 60 days post-STZ, respectively ($P<0.001$), when compared with those of control rats. Left kidney wet weights were increased 1.1 and 1.2 times, 2 days and 21 days post-STZ ($P<0.05$), but were unchanged 60 days post-STZ, when compared with those of control rats. Moreover, kidney wet weights per 100 g/BW were 1.2, 1.8 and 1.7 times higher in diabetic rats, 2 days, 21 days and 60 days post-STZ, respectively ($P<0.001$), compared with those of controls. Food intakes per 24h remained unchanged 2 days post-STZ administration but increased 1.6 to 1.8 times, 21 and 60 days post-STZ ($P<0.001$). Water intake and urine volume per 24h increased 4-6 times and 9-20 times, respectively, 2-60 days post-STZ administration ($P<0.001$).

[Position of Table 1]

GHRH-R mRNA transcript levels in the anterior pituitary

In the anterior pituitary, GHRH-R mRNA levels were analyzed by Northern blotting. The presence of ≈ 2.5 - and ≈ 4 -kb GHRH-R mRNA transcripts (doublets) was detected in the gland of control and diabetic rats, 2, 21 and 60 days post-STZ

(Figs. 1A, 2A and 3A), as previously reported (4, 25). Levels of GHRH-R mRNA transcripts showed several changes according to the length and severity of diabetes. When GHRH-R mRNA content was expressed as per 12 μ g total RNA (Fig. 1B, 2B, 3B), the level of the 2.5 kb-transcript increased 1.4 and 1.5 times ($P < 0.05$), 2 and 21 days post-STZ, respectively, but was unchanged 60 days post-STZ in comparison to that of control rats, indicating of a decrease in comparison to shorter period of diabetes. A significant increase of the content of the 4 kb-transcript was also seen in 21 and 60 days post-STZ (2.8 and 1.7 times, respectively; $P < 0.001$, $P < 0.05$), in comparison to that of controls. A trend was also detected in the pituitary of rats 2 days post-STZ. Combined level of 2.5-kb and 4-kb transcripts increased 1.5 and 1.8 times, 2 and 21 days post-STZ ($P < 0.01$) and remained unchanged 60 days post-STZ, in comparison to that of controls. The 4kb/2.5kb ratio of transcripts was not modified 2 days post-STZ, but increased 2.2 and 1.7 times, 21 and 60 days post-STZ, respectively ($P < 0.001$, $P < 0.05$), in comparison to that of controls.

When GHRH-R mRNA transcripts were expressed per pituitary total RNA content (Fig. 1C, 2C, 3C), the level of the 2.5-kb transcript was not significantly changed 2 days post-STZ, but decreased 1.6 and 2.9 times, 21 and 60 days post-STZ ($P < 0.05$, $P < 0.001$), respectively, when compared with that of controls. Changes in levels of the 4-kb transcript did not reach significance when compared with controls. Combined levels of 2.5-kb and 4-kb transcripts were increased 1.5 time, 2 days post-STZ ($P < 0.01$), tend to decrease, 21 days post-STZ, and decreased 2.4 times, 60 days post-STZ ($P < 0.001$), when compared with those of

controls. The level of the 4kb/2.5kb ratio increased 2.0 and 1.8 times, 21 and 60 days post-STZ, respectively ($P<0.01$, $P<0.05$), when compared to that of controls.

[Position of Figures 1, 2, 3]

GHRH-R mRNA levels in the renal medulla

In the renal medulla, as Northern blotting lacks sufficient sensitivity to perform a precise quantification, GHRH-R mRNA levels were analyzed by RPA. The sum of both signals was considered as total density of GHRH-R mRNA. Two, 21 and 60 days post-STZ administration, GHRH-R mRNA levels were significantly decreased in the medulla of diabetic rats compared with those of controls (Fig. 4A). When expressed per 20 μ g total RNA (Fig. 4B), GHRH-R mRNA levels were 2.2, 1.3 and 1.4 times lower in the medulla from diabetic rats compared with those of controls, respectively ($P<0.001$, $P<0.05$ and $P<0.01$).

When GHRH-R mRNA levels, expressed per medulla total RNA content were analyzed (Fig. 4C), they were 1.8, 1.6 and 1.5 times lower in the medulla from diabetic rats compared with those of controls, respectively ($P<0.001$, $P<0.01$ and $P<0.05$).

[Position of Figure 4]

DISCUSSION

In type-I diabetic rats, several perturbations of the somatotroph GHRH/GH/IGF-I and renal GH/IGF-I axes have been reported (30-42). However, studies addressing directly the impact of short and long-term diabetes on the regulation of pituitary and renal GHRH-R are lacking. In the anterior pituitary, the GHRH-GHRH-R system exerts a critical role in stimulating GH secretion and synthesis (6, 7) as well as in somatotroph proliferation and differentiation (8-11). In the kidney, more specifically in the medullary Henle's loop which contains the highest level of GHRH-R mRNA in this organ (24), activation of the GHRH-R by GHRH may be required to stimulate cell proliferation or maturation and/or to participate directly or indirectly to ion homeostasis.

In the anterior pituitary from 2-month-old healthy rats, the level of the 4-kb GHRH-R mRNA transcript corresponds to $\approx 20\%$ of that of the 2.5 kb (25). In STZ-diabetic rats, these transcripts were shown to be submitted to a complex regulation depending upon the duration and severity of diabetes. The analysis of mRNA levels expressed as per μg of total RNA was performed in order to study somatotroph changes of expression. Two days post-STZ administration, a time at which no change has occurred in food intake of diabetic rats, the 2.5-kb transcript was significantly increased and the 4/2.5-kb ratio remained unchanged. Twenty-one days post-STZ administration, both the levels of 2.5- and 4-kb transcripts were increased (1.5-2.8 times) as well as that of the 4/2.5-kb ratio, underlying the drastic increase of the 4-kb transcript. Sixty days post-STZ administration, both the levels

of 4-kb transcript and 4/2.5-kb ratio remained elevated (1.7 times). As changes in the size of the anterior pituitary and amount of various cell type densities may impact on GHRH-R mRNA densities identified at the cellular level, they were also analyzed per anterior pituitary total RNA content. The present results indicate that the reduction in the size of the gland with progression of the disease contributes to a significant decline of GHRH-R mRNA contents at the physiological level. As GHRH hypothalamic content was reported to increase 1.4 times at day 2 and 4 post-STZ administration (100 mg/kg BW) (36), but to significantly decrease thereafter (35, 36), it might be proposed that the GHRH-R originating from the 2.5 kb transcript is up-regulated by GHRH, in early stages of diabetes and then down-regulated. Interestingly, the 4-kb transcript was also up regulated, although its pattern of regulation differed from that of the 2.5-kb transcript. In long-term diabetes, pituitary GHRH-R mRNA levels were similarly regulated to those reported in aging (44), suggesting that other hormonal and metabolic factors than hypothalamic GHRH may affect GHRH-R expression in this pathological condition as in aging. Moreover, since elevation of 4/2.5-kb transcript ratio has been associated to a significant diminution of GHRH binding site affinity and capacity, particularly in aging (25), it is proposed that GHRH binding will also be perturbed in diabetic states, bringing an explanation for the decreased ability of somatotrophs to secrete GH (31).

In the renal medulla of diabetic and control rats, a single pattern of two protected GHRH-R mRNA fragments was identified, as previously reported (24). In this tissue, diabetes regulated GHRH-R mRNA levels differently from those in the pituitary, as GHRH-R mRNA levels were drastically decreased 2 days post-

STZ administration (2.2 times) and the diminution being partly reverted 21 and 60 days post-STZ administration. Such a tissue-specific regulation of GHRH-R mRNA levels has also been reported in the course of development and aging (24). In the medulla, as in the anterior pituitary, both the 2.5- and 4-kb GHRH-R mRNA transcripts are present and their respective intensity was reported to be 2.3 and 1.3 times lower than that in the anterior pituitary (24). Although the different types of assays used to quantify GHRH-R mRNA levels in the pituitary and renal medulla only allow for a semi-quantitative comparison, we suggest that the direction and magnitude of changes being indicative of a tissue-specific regulation. This is reinforced by the fact that in a recent pilot study using two groups of anterior pituitary expressing different levels of GHRH-R, we obtained consistent difference among groups, independently of the method chosen to analyze GHRH-R mRNA levels (summation of 2.5- and 4-kb transcripts from Northern blotting experiments versus summation of both protected fragments from RPA) (unpublished data).

The divergence in the regulation of GHRH-R mRNA transcript levels in the pituitary and renal medulla of diabetic rats could be explained in part by a greater sensitivity of Henle's loop cells to GHRH than somatotrophs, thus inducing a more rapid down-regulation of GHRH-R mRNA levels. Alternatively, the lower concentration of GHRH-R in renal tissue could result in a fast receptor down-regulation (24). At the present time, neither the origin of the GHRH (23) mediating renal GHRH-R down-regulation nor the potential effect of GHRH on cell proliferation and/or maturation has been reported. However, based on present results, it might be proposed that the increase of GHRH-R mRNA levels as expressed per fixed amount of total RNA, could be indicative of a GHRH-induced

proliferative state. This effect is blunted when GHRH-R mRNA levels are expressed per medulla total RNA content, indicating that other medullary cell populations may increased in the course of diabetes.

Molecular and cellular mechanisms of pituitary and renal GHRH-R regulation may be proposed in this animal model of type-I diabetes. In STZ-diabetic rats, circulating levels of glucocorticoids are increased (45) while those of thyroid hormones are decreased (46, 47). Both nuclear hormones are necessary for an optimal expression of the GHRH-R in the pituitary (26-29) and likely in the renal medulla. Thus, the dynamic of changes in serum hormonal levels will have to be determined to establish a causal role in the dysregulation of pituitary and renal GHRH-R. Finally, in STZ-diabetic rats, high serum glucose levels have been shown to promote oxidative stress and apoptosis (48). A recent in vitro study has shown that high glucose levels may induce down-regulation of the angiotensin type 1 receptor via a protein kinase C-oxidative stress-transforming growth factor- β 1 signal cascade in primary cultured rabbit proximal tubule cells (49). As glucotoxicity may affect somatotroph and Henle's loop cells differentially, it could exert a tissue-specific regulation of GHRH-R expression. Whether or not, in this metabolic state of glucotoxicity, GHRH-mediated activation of GHRH-R may exert a protective role will now deserve investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr Kelly E Mayo (Department of Biochemistry, Molecular Biology and Cell Biology, Northwestern University, Evanston, IL) for providing us with the RPR64 rGHRH-R cDNA and to Dr P Chartrand (CHUM Research Center, University of Montreal, Montreal, QC, CA) for giving us a GAPDH cDNA.

This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research. J Strecko (JS) and C Boisvert are recipients of a studentship from Fonds de la Recherche en Santé du Québec - (FRSQ). JS was recipient of a summer studentship from Association Diabète Québec. P Gaudreau is recipient of a scholarship chercheur-boursier national from FRSQ.

REFERENCES

1. Seifert H, Perrin M, Rivier J, Vale W 1985 Binding sites for growth hormone-releasing factor on rat anterior pituitary cells. *Nature* 313: 487-489
2. Lau YS, Camoratto AM, Muller M, White, Moriarty CM 1991 Effect of lead on TRH and GHRH binding in rat anterior pituitary membranes. *Toxicology* 68: 169-179
3. Abribat T, Boulanger L, Gaudreau P 1990 Characterization of [125I-Tyr10]human growth hormone-releasing factor(1-44)amide binding to rat pituitary: evidence for high and low affinity classes of sites. *Brain Res* 528: 291-299
4. Mayo KE 1992 Molecular cloning and expression of a pituitary specific receptor for growth hormone- releasing factor. *Mol Endocrinol* 6: 1734-1744
5. Bilezikjian LM, Vale WW 1983 Stimulation of adenosine 3', 5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 113: 1726-1731
6. Tannenbaum GS, Ling N 1984 The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology* 115: 1952-1957
7. Barinaga M, Bilezikjian LM, Vale WW, Rosenfeld MG, Evans RM 1985 Independent effects of growth hormone-releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 314: 279-281

8. Billestrup N, Swanson LW, Vale W 1986 Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6854-6857
9. Godfrey P, Rahal JO, Beamer WG, Copeland NG, Jenkins NA, Mayo KE 1993 GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nat Genet* 4: 227-232
10. Lin SC, Lin CR, Gukovsky I, Lusic AJ, Sawchenko PE, Rosenfeld MG 1993 Molecular basis of the little mouse phenotype and implication for cell type-specific growth. *Nature* 364: 208-213
11. Mayo KE, Hammer RE, Swanson LW, Brinster RL, Rosenfeld MG, Evans RM 1988 Dramatic pituitary hyperplasia in transgenic mice expressing a human growth hormone-releasing factor gene. *Mol Endocrinol* 2: 606-612
12. Wong AO, Moor BC, Hawkins CE, Narayanan N, Kraicer J 1995 Cytosolic protein kinase A mediates the growth hormone (GH)-releasing action of GH-releasing factor in purified rat somatotrophs. *Neuroendocrinology* 61: 590-600
13. Chen C, Xu R, Clarke IJ, Ruan M, Loneragan K, Roh SG 2000 Diverse intracellular signaling systems used by growth hormone-releasing hormone in regulating voltage-gated Ca²⁺ or K channels in pituitary somatotropes. *Immunol Cell Biol* 2000 78: 356-368
14. Zeitler P, Siriwardana G 2000 Stimulation of mitogenic-activated protein kinase pathway in rat somatotrophs by growth hormone-releasing hormone. *Endocrine* 12: 257-264

15. Lin C, Lin SC, Chang CP, Rosenfield MG 1992 Pit-1 dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360: 765-768
16. Hsiung HM, Smith DP, Zhang XY, Bennett T, Rosteck PR Jr, Lai MH 1993 Structure and functional expression of a complementary DNA for porcine growth hormone-releasing hormone receptor. *Neuropeptides* 25:1-10
17. Horikawa R, Gaylinn BD, Lyons CE, Thorner MO 2001 Molecular cloning of ovine and bovine growth hormone-releasing hormone receptors: the ovine receptor is C-terminally truncated. *Endocrinology* 142: 2660-2668
18. Tang J, Lagacé G, Castagné J, Collu R 1995 Identification of human growth hormone-releasing hormone receptor splicing variants. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2381-2387
19. Hashimoto K, Koga M, Motomura T, Kasayama S, Kouhara H, Ohnishi T, Arita N, Hayakawa T, Sato B, Kishimoto T 1995 Identification of alternatively spliced messenger ribonucleic acid encoding truncated growth hormone-releasing hormone receptor in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2933-2939
20. Gaylinn BD, Harrison JK, Zysk JR, Lyons CE, Lynch KR, Thorner MO 1993 Molecular cloning and expression of human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 7:77-84
21. Miller TL, Godfrey PA, Dealmeida VI, Mayo KE 1999 The rat growth hormone-releasing hormone receptor gene: structure, regulation, and generation of receptor isoforms with different signaling properties. *Endocrinology* 140:4152-4165

22. Zeitler P, Stevens P, Siriwardana G 1998 Functional GHRH receptor carboxyl terminal isoforms in normal and dwarf (dw) rats. *J Mol Endocrinol* 21:363-371
23. Matsubara S, Sato M, Mizobuchi M, Niimi M, Takahara J 1995 Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology* 136:4147-4150
24. Boisvert C, C Paré, C Veyrat-Durebex, A Robert, S Dubuisson, G Morel and P Gaudreau. Localization and regulation of a functional growth hormone-releasing hormone receptor in the rat renal medulla. *Endocrinology* 143: 1475-1484.
25. Girard N, Boulanger L, Denis S, Gaudreau P 1999 Differential *in vivo* regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor by GHRH in young and aged rats. *Endocrinology* 140:2836-2842
26. Korytko AI, Zeitler P, Cuttler L 1996 Developmental regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression in the rat. *Endocrinology* 137:1326-1331
27. Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Kineman RD, Frohman LA, Wakabayashi I 2000 Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone secretagogue receptor gene expression. *J Neuroendocrinol* 12:481-485
28. Miller TL, Mayo KE 1997 Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 138:2458.
29. Petersenn S, Schulte HM 2000 Structure and function of the growth-hormone-releasing hormone receptor. *Vitam Horm* 59:35-69

30. Tannenbaum GS 1981 Growth hormone secretory dynamics in streptozotocin diabetes: evidence of a role for endogenous circulating somatostatin. *Endocrinology* 108:76-82
31. Tannenbaum GS, Colle E, E, Gurd W, Wanamaker L 1981 Dynamic time-course studies of the spontaneously diabetic BB Wistar rat. I. Longitudinal profiles of plasma growth hormone, insulin, and glucose. *Endocrinology* 109:1872-1879
32. Ndon JA, Giustina A, Wehrenberg W 1992 Hypothalamic regulation of impaired growth hormone secretion in diabetic rats. 1. Studies in spontaneously diabetic BB Worcester rats. *Neuroendocrinology* 55:500-505
33. Olchovsky D, Bruno JF, Wood TL, Gelato MC, Leidy JW, Gilbert JM, Berelowitz M 1990 Altered pituitary growth hormone (GH) regulation in streptozotocin-diabetic rats: a combined defect of hypothalamic somatostatin and GH-releasing factor.
34. Olchovsky D, Bruno JF, Berelowitz M 1996 Growth hormone-releasing factor expression is discordantly regulated in the hypothalamus and testis of streptozotocin-diabetic rats. *J Endocrinol* 148:189-192
35. Busiguina S, Argente J, Garcia-Segura LM, Chowen JA 2000 Anatomically specific changes in the expression of somatostatin, growth hormone-releasing hormone and growth hormone receptor mRNA in diabetic rats *J Neuroendocrinol* 12: 29-39
36. Leidy JW, Cugini CD, Driscoll Jr HK, Chertow BS 1995 Time course of hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin content in streptozotocin diabetic rats: evidence for early changes in hypothalamic regulation. *Brain Research* 681:84-90

37. Menon RK, Stephan DA, Rao RH, Shen-Orr Z, Downs LS Jr, Roberts CT Jr, Leroith D, Sperling Ma 1994 Tissue-specific regulation of the growth hormone receptor gene in streptozotocin-induced diabetes in the rat. *J Endocrinol* 142:453-462
38. Bornfeldt KE, Arnqvist HJ, Enberg B, Mathews LS, Norstedt 1989 Regulation of insulin-like growth hormone receptor gene expression by diabetes and nutritional state in rat tissues. *J Endocrinol* 122:651-656
39. Flyvbjerg A, Bornfeldt KE, Marshall SM, Arnqvist HJ, Orskov H 1990 Kidney IGF-I mRNA in initial renal hypertrophy in experimental diabetes in rats. *Diabetologia* 33:334-338
40. Fervenza FC, Tsao T, Hoffman AR, Rabkin R 1997 Regional changes in the intra renal insulin-like growth factor-1 axis in diabetes. *Kidney International* 51:811-818
41. Gronbaek H, Nielsen B, Frystyk J, Flyvbjerg A, Orskov H 1996 Effect of lanreotide on local kidney IGF-I and renal growth in experimental diabetes in the rat. *Exp Nephrol* 4:295-303
42. Muchaneta-Kubara EC, Sayed-Ahmed N, Besbas N, Zhang G, Cope GH, el Nahas AM 1994 Experimental diabetic renal growth: role of growth hormone and insulin-like growth factor-I. *Nephrol Dial Transplant* 9:1395-1401
43. Evan AP, Mong SA, Gattone VH, Connors BA, Aronoff GR, Luft FC 1984 The effect of streptozotocin and streptozotocin-induced diabetes on the kidney. *Ren Physiol* 7:78-89
44. Gaudreau P, Boulanger L, Morel G. 1999 Axe somatotrope et vieillissement: importance du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance. *Médecine Science* 15: VII.

45. Chan O, Chan S, Inouye K, Vranic M, Matthews SG 2001 Molecular regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in streptozotocin-induced diabetes: effects of insulin treatment. *Endocrinology* 142):4872-4879
46. Ortiz-Caro J, Gonzalez C, Jolin T 1984 Diurnal variations of plasma growth hormone, thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine in streptozotocin-diabetic and food-restricted rats. *Endocrinology* 115:2227-2232
47. Rodriguez M, Rodriguez, F, Jolin T, Santisteban P 1995 Comparative effects of food restriction, fasting, diabetes and thyroidectomy on growth hormone and thyrotropin gene expression in the rat pituitary. *European Journal of Endocrinology* 133:110-116
48. Ha H, Yu MR, Choi YL, Lee HB 2001 Activation of protein kinase c-delta and c-epsilon by oxidative stress in early diabetic rat kidney. *Am J Kidney* 38: S204-S207
49. Park SH, Han HJ 2002 The mechanism of angiotensin II binding downregulation by high glucose in primary renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F228-F237

TABLE 1. Body weight, kidney wet weight, food and water intakes and biochemical parameters of rats with short-term (2 and 21 days) and long-term (60 days) STZ-induced diabetes

	2 days post-injection		21 days post-injection		60 days post-injection	
	Control	Diabetic	Control	Diabetic	Control	Diabetic
BW (g)	Day 0 324±5 Sacrifice 338±3 ^a	331±3 302±4 ^{b,c}	298±8 397±12 ^e	302±6 267±12 ^{c,f}	232±3 525±19 ^e	234±3 313±14 ^{b,c}
Right kidney wet weight (g)	Sacrifice 1.15±0.02	1.24±0.03 ^d	1.3±0.04	1.5±0.07 ^d	1.7±0.1	1.8±0.1
Right kidney wet weight/100g BW (g)	Sacrifice 0.34±0.01	0.41±0.01 ^c	0.33±0.01	0.58±0.01 ^c	0.33±0.01	0.56±0.02 ^c
Food intake (g/24h)	Day 0 30±2 Sacrifice 31±3	28±2 27±5	30±1 28±1	34±3 44±3 ^{c,f}	23±1 32±1 ^e	23±1 59±5 ^{b,c}
Water intake (g)	Day 0 33±2 Sacrifice 33±1	39±2 127±10 ^{b,c}	35±1 39±2	34±2 224±16 ^{b,c}	40±2 49±2 ^g	39±2 241±17 ^{b,c}
Blood glucose (mg/dL)	Sacrifice 98±3	>600 ^c	125±6	>600 ^c	118±2	>600 ^c
Glucosuria (mg/dL)	Sacrifice <60	>2000 ^c	<60	>2000 ^c	<60	>2000 ^c
Urine volume (mL/24h)	Day 0 12±1 Sacrifice 9±1	14±1 82±8 ^{b,c}	14±1 16±2	13±1 >250 ^{b,c}	14±1 ND	12±2 >250 ^b

Day 0 = streptozotocin injection. ND = not determined.

Values represent the mean \pm SEM of 7 to 9 rats per group.

- ^a $P < 0.05$ when compared with controls at day 0
- ^b $P < 0.001$ when compared with diabetics at day 0
- ^c $P < 0.001$ when compared with controls at sacrifice
- ^d $P < 0.05$ when compared with controls at sacrifice
- ^e $P < 0.001$ when compared with controls at day 0
- ^f $P < 0.05$ when compared with diabetics at day 0
- ^g $P < 0.01$ when compared with controls at day 0

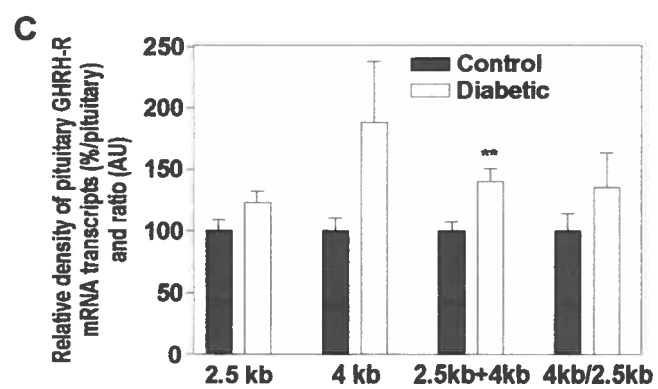
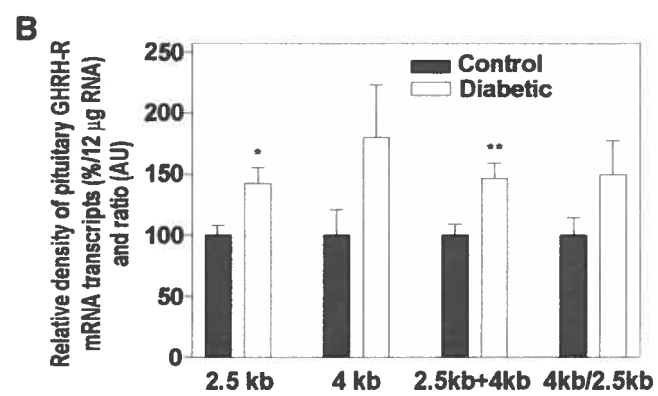
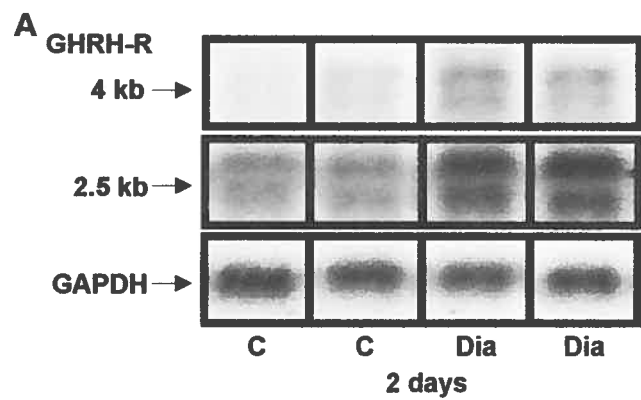


Fig. 1. GHRH-R mRNA levels in the anterior pituitary from control (C) and diabetic male rats, 2 days post-STZ administration. Twelve μg of total RNA was analyzed by Northern blotting for each group. A) Autoradiographic representation of GHRH-R mRNA transcripts and GAPDH. B) GHRH-R mRNA densities expressed per 12 μg total RNA or, C) per pituitary total RNA content, in % of relative density to that obtained in pituitaries from controls. Results represent the mean \pm SEM of an experiment performed in singulate, using 8 rats per group.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the pituitary from controls (Student's t test).

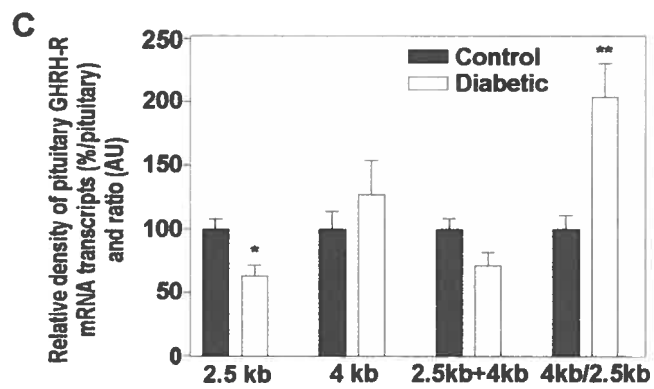
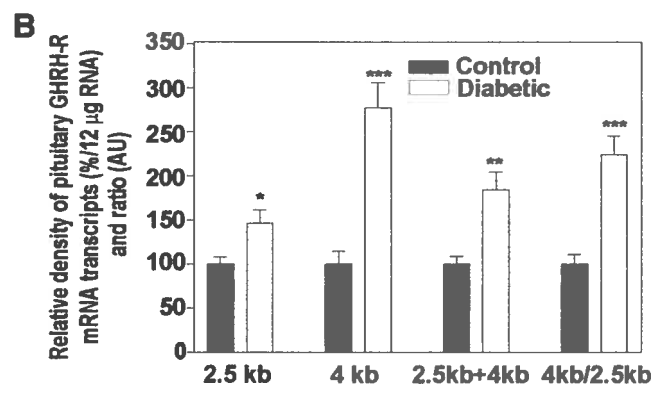
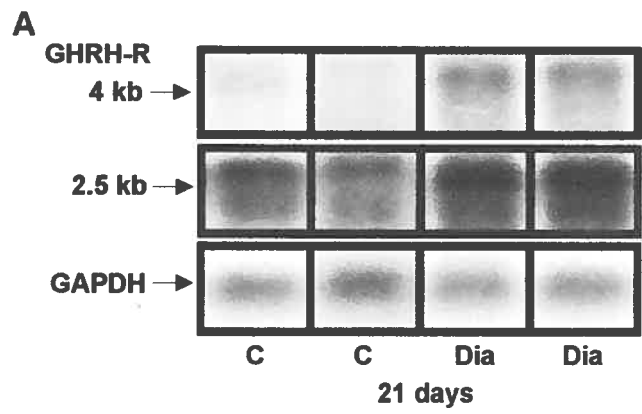


Fig. 2. GHRH-R mRNA levels in the anterior pituitary from control (C) and diabetic male rats, 21 days post-STZ administration. Twelve μg of total RNA was analyzed by Northern blotting for each group. A) Autoradiographic representation of GHRH-R mRNA transcripts and GAPDH. B) GHRH-R mRNA densities expressed per 12 μg total RNA or, C) per pituitary total RNA content, in % of relative density to that obtained in pituitaries from controls. Results represent the mean \pm SEM of an experiment performed in singulate, using 8-9 rats per group.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the pituitary from controls (Student's t test).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the pituitary from controls (Student's t test).

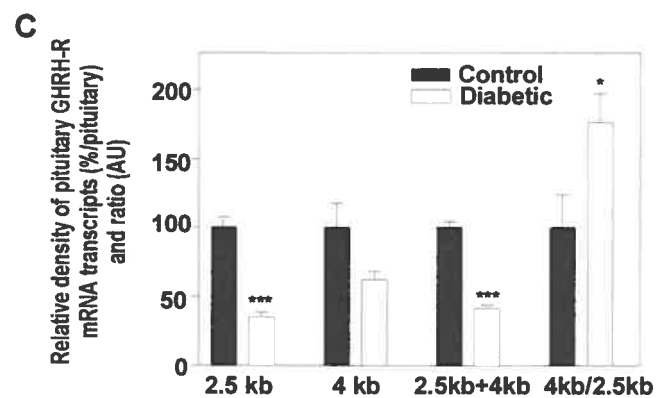
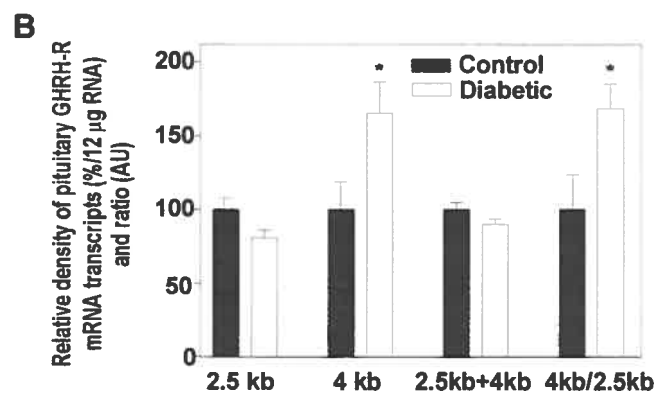
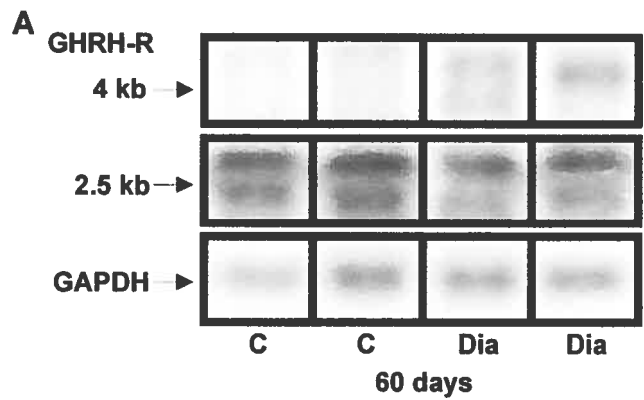


Fig. 3. GHRH-R mRNA levels in the anterior pituitary from control (C) and diabetic male rats, 60 days post-STZ administration. Twelve μg of total RNA was analyzed by Northern blotting for each group. A) Autoradiographic representation of GHRH-R mRNA transcripts and GAPDH. B) GHRH-R mRNA densities expressed per 12 μg total RNA or, C) per pituitary total RNA content, in % of relative density to that obtained in pituitaries from controls. Results represent the mean \pm SEM of an experiment performed in singulate, using 8 rats per group.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the pituitary from controls (Student's t test).

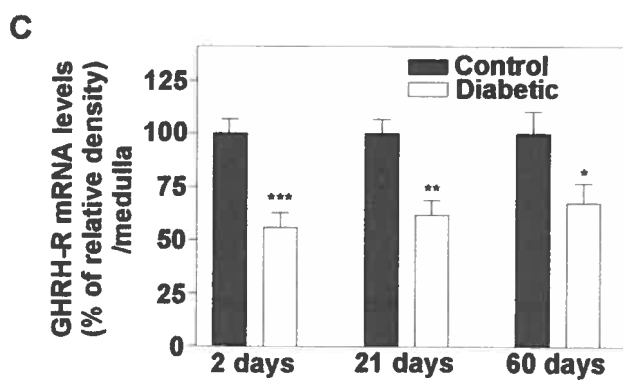
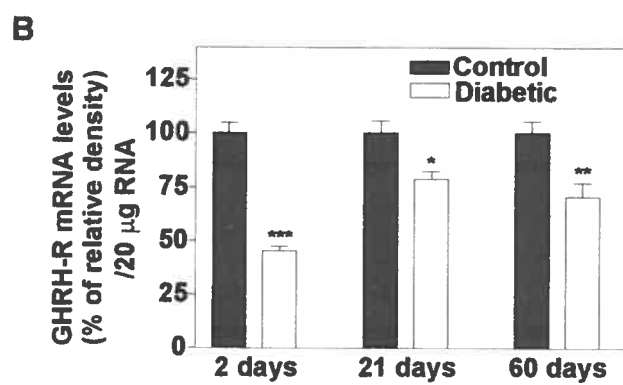
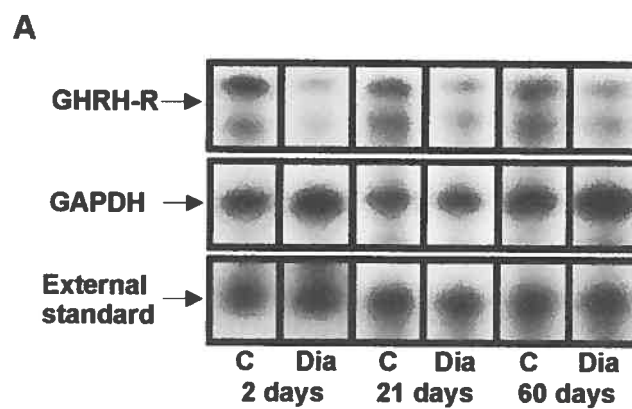


Fig. 4. GHRH-R mRNA levels in the renal medulla from control (C) and diabetic male rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration. Twenty μg of total RNA was analyzed by RPA for each group. A) Autoradiographic representation of GHRH-R mRNA, GAPDH and RPR-64 Msc I RNA standard (40 μg) signals. B) GHRH-R mRNA densities expressed per 20 μg total RNA or, C) per medulla content total RNA, in % of relative density to that obtained in the medulla from controls. Results represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in triplicate, using 8-9 rats per group.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the medulla from controls (Student's t test).

3.0 DISCUSSION

La stimulation de cellules semi-purifiées d'anse de Henlé par le GHRH a permis de mettre en évidence la présence d'un nouveau GHRH-R fonctionnel dans le rein. En effet, le GHRH contrôle à la baisse les niveaux d'ARNm du GHRH-R, suggérant une désensibilisation homologue qui serait médiée par l'internalisation de ce récepteur rénal selon un processus dépendant de la température et de la durée d'incubation en présence de GHRH. De plus, des résultats préliminaires, obtenus récemment dans notre laboratoire, ont mis en évidence une internalisation spécifique du Fluo-GHRH dans les cellules d'anse de Henlé mince en culture selon un mécanisme dépendant de la température et du temps d'incubation (304). Ces résultats renforcent l'étude de Boulanger et coll. dans laquelle une liaison spécifique, saturable et réversible du ^{125}I -GHRH a été mis en évidence dans des homogénats de médulla de rein (303).

Un phénomène de désensibilisation homologue a également été rapporté pour le récepteur hypophysaire où une stimulation au GHRH peut provoquer une diminution de la production en AMPc ainsi que de la sécrétion de GH (170-172, 174, 175). Ces phénomènes demeurent à être investigués pour le GHRH-R dans les cellules de l'anse de Henlé mince ascendante. Le processus d'internalisation a également été observé pour le récepteur hypophysaire où l'internalisation du complexe ligand/récepteur conduit à la dégradation du ligand au niveau des lysosomes. La présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique, le cycloheximide, diminue la densité du récepteur à 50% comparé au témoin suggérant la synthèse de nouveaux récepteurs du GHRH suivant son internalisation (305). L'incubation de cellules d'hypophyse antérieure en présence de monensine, un inhibiteur du recyclage, permet d'observer une diminution de la liaison du hGHRH(1-44) NH_2 fluorescent à la surface cellulaire suggérant un

mécanisme de recyclage du GHRH-R (306). Ces résultats suggèrent une désensibilisation du GHRH-R par son internalisation (305). Finalement, l'incubation de cellules hypophysaires en présence d'un inhibiteur du processus d'internalisation par les calvéolines, la Filipine III, a permis de suggérer l'utilisation de ce mécanisme lors de l'internalisation du GHRH-R hypophysaire (306). Le mécanisme employé par le GHRH-R rénal lors de son internalisation demeure à être investigué. Cependant, la détermination d'un récepteur rénal du GHRH fonctionnel permettait de poursuivre l'étude de sa fonction rénale.

Afin d'obtenir des indices sur son rôle, la localisation du GHRH-R a été effectuée dans le rein. Les résultats, obtenus en RPA, ont confirmé que l'ARNm du GHRH-R est le plus abondant au niveau de la médulla tel que décrit par Matsubara et coll. en buvardage Northern (96). Plus spécifiquement, l'ARNm est retrouvé en plus faible concentration dans la partie épaisse de l'anse de Henlé et en concentration élevée dans la partie mince de l'anse de Henlé où la partie descendante est impliquée dans la réabsorption de l'eau et la partie ascendante, dans l'équilibre ionique lors du processus de concentration de l'urine (210). Cette localisation cellulaire spécifique de l'ARNm du GHRH-R suggère un nouveau rôle du système GHRH/GHRH-R dans le rein. Par buvardage Northern, les deux transcrits de 2.5 et 4 kb, habituellement retrouvés dans l'hypophyse (107, 119), ont été détectés. Matsubara et coll. ont observé, avec la même technique de détection, la présence du transcrit du GHRH-R de 4 kb dans la médulla de rein (96). Des conditions expérimentales non-optimales pourraient être à l'origine de cette discordance. L'abondance totale des deux transcrits est environ 2 fois plus faible dans la médulla que l'hypophyse, la concentration du transcrit de 4 kb étant

1.3 fois plus faible que celle du transcrit de 2.5 kb. Le transcrit de 2.5 kb est donc, comme dans l'hypophyse, la forme prédominante au niveau de la médulla rénale. D'après la similarité des transcrits dans les deux tissus, l'hypothèse que le transcrit de 2.5 kb du GHRH-R rénal correspond à la forme active du récepteur de 423 aa tel que dans l'hypophyse peut être avancée. La nature du transcrit de 4 kb demeure inconnue dans les deux tissus. Finalement, le séquençage d'une portion de l'ADNc du GHRH-R rénal démontrant une identité de 100% avec la séquence de l'ADNc du GHRH-R hypophysaire de rat (96, 107) renforce l'hypothèse de la présence des mêmes transcrits dans les deux tissus. Cependant cette hypothèse ne pourra être vérifiée qu'à la suite du clonage du récepteur rénal. -

Au niveau de la protéine, une hétérogénéité spécifique au tissu et à l'espèce de la taille moléculaire apparente du GHRH-R a été rapportée chez l'humain et le rat. En effet, chez l'humain, des formes immunoréactives de 50, 52 et 55 kDa ont été retrouvées dans l'hypophyse (164, 302) et de 52 kDa dans le rein (302). De plus, la transfection de cellules BHK avec le hGHRH-R permet la détection immunologique d'une protéine de 45 kDa (303). Chez le rat, des formes à 65, 47 et 28 kDa ont été retrouvées dans l'hypophyse antérieure tandis que des formes à 65, 55 et 38kDa ont été observées par réticulation chimique dans la médulla rénale (303). Puisque la forme clonée par Mayo de 1629 pb correspond à un poids moléculaire de 47kDa, il a été suggéré que les formes de plus haut poids moléculaire proviendraient de la glycosylation tandis que la protéolyse serait responsable des formes de plus faible poids moléculaire tel qu'observé dans les hypophyses bovines et ovines (162, 166). Une hétérogénéité de la taille moléculaire apparente du récepteur du VIP liée à sa glycosylation spécifique

selon l'espèce et le tissu a également été observée (307). La différence au niveau des tailles moléculaires apparentes pourrait également être expliquée par la présence d'isoformes du GHRH-R produit par épissage alternatif et contenant soit une insertion ou une délétion d'aa tel qu'observé dans des cellules hypophysaires et tumorales (120-123, 125). Les résultats obtenus, concernant les transcrits d'ARNm du GHRH-R et de la protéine du GHRH-R dans le rein et l'hypophyse antérieure, indiquent que les transcrits semblent identiques dans ces deux tissus mais qu'une hétérogénéité au niveau de la protéine, provenant soit d'un processus d'épissage alternatif ou de modifications post-traductionnels spécifiques au tissu, serait présente.

Puisque l'anse de Henlé mince constitue le site principal de synthèse du GHRH-R, des études de colocalisation immunocytochimique, à l'aide de marqueurs rénaux, ont été effectuées sur ce segment du néphron afin de déterminer la localisation cellulaire précise du GHRH-R. Le GHRH-R a été co-localisé avec le canal au chlore, CIC-k1, dans les cellules d'anse de Henlé mince ascendante purifiées à l'aide d'un anticorps anti-CIC-k1 et -k2. Puisque le canal au chlore, CIC-k2, n'est pas synthétisé dans l'anse de Henlé mince, le signal immunologique obtenu provient exclusivement de la détection du canal au chlore, CIC-k1. Ces résultats sont en accord avec la localisation du GHRH-R décrite par Fujinaka et coll. dans des homogénats de reins humains en immunobuvardage Western à l'aide d'un anticorps anti-GHRH-R (302). La détection du GHRH-R dans un type cellulaire spécifique tel que celles de l'anse de Henlé mince ascendante, suggère un rôle du GHRH-R dans une fonction spécifique à cette portion du néphron tel que l'équilibre ionique. Une fonction principale de l'anse de

Henlé mince ascendante étant la réabsorption de chlore *via* le transporteur de chlore, CIC-k1 (213), le rôle du GHRH-R rénal dans l'équilibre ionique pourrait se situer au niveau de la régulation de l'activité ou de l'expression de CIC-k1. Par ailleurs, puisque le GHRH-R joue un rôle au niveau de la prolifération des somatotropes, le GHRH-R rénal pourrait être impliqué dans la prolifération/spécialisation des cellules de l'anse de Henlé mince ascendante facilitant l'établissement de la capacité à concentrer l'urine de cette partie du néphron.

Par la suite, la régulation de l'expression du GHRH-R selon un dimorphisme sexuel et au cours du développement et du vieillissement a été étudiée et comparée à l'hypophyse puisque l'expression du GHRH-R hypophysaire est modulée dans ces conditions physiologiques. Les résultats de la régulation du GHRH-R rénal au cours du développement ont permis d'observer des niveaux d'ARNm du GHRH-R plus faible chez la femelle de 70 j suggérant un dimorphisme sexuel. Cependant l'existence d'un dimorphisme sexuel devra être confirmée par des études dans lesquelles des rats mâles et femelles, ayant subi l'ablation des gonades, sont soumis ou non à une thérapie de remplacement hormonal. Dans l'hypophyse, des résultats divergents n'ont pu permettre d'établir avec certitude l'existence d'un dimorphisme sexuel au niveau de l'expression du GHRH-R. En effet, chez des rates Sprague Dawley de 3 mois, les niveaux d'ARNm du GHRH-R représentent 15% de ceux des mâles (186). Chez les rats LOU/C, les niveaux des deux transcrits d'ARNm du GHRH-R sont 2-3 fois plus faibles chez la femelle comparé au mâle (187). Cependant des niveaux similaires d'ARNm du GHRH-R ont été observés chez des rats nouveau-nés (1 j), jeunes (10 et 30 j) et adultes (75

j) des deux sexes (188). Ces résultats contradictoires pourraient être attribués à différents groupes d'âge étudiés et/ou aux différentes techniques d'analyse utilisées.

Dans la médulla rénale, l'étude de la régulation de l'ARNm du GHRH-R lors du développement a démontré des niveaux maximaux entre 30 et 70 j. Les mêmes résultats sont obtenus lorsque les niveaux d'ARNm du GHRH-R sont exprimés par une concentration d'ARN total dans la médulla entière. Cette régulation est synchronisée avec le développement de la capacité à concentrer l'urine qui devient maximale à 6 semaines chez le rat (308-310). De plus, CIC-k1, un transporteur de chlore localisé dans l'anse de Henlé mince ascendante et impliqué dans la capacité à concentrer l'urine (311), est régulé d'une façon similaire au cours du développement puisque les niveaux d'ARNm sont significativement plus élevés à 19, 21 et 56 j comparés à 1, 3 et 5 j (308). Ces résultats suggèrent donc que le GHRH-R puisse être impliqué directement ou indirectement dans une fonction rénale spécifique telle que la capacité à concentrer l'urine. Considérant l'effet positif et direct des glucocorticoïdes sur la régulation de l'expression du GHRH-R hypophysaire (176-180) la présence de leurs récepteurs au niveau des cellules de l'anse de Henlé mince (312) ainsi que l'élévation de leur concentration plasmatique au cours de la deuxième et troisième semaine de vie (313-316), une contribution positive à la régulation de l'expression du GHRH-R rénal peut être postulée.

Dans l'hypophyse antérieure, l'étude de la régulation de l'ARNm du GHRH-R lors du développement a démontré des concentrations maximales durant la

période périnatale (188, 189) suggérant une régulation de l'ARNm du GHRH-R tissu-spécifique. En effet, des taux maximaux d'ARNm du GHRH-R sont détectés entre les jours j19.5 de gestation et j2 après la naissance et ceux-ci diminuent ensuite entre les jours 10 et 75 (188, 189). Cependant, Korytko et coll. ont observé une diminution drastique des niveaux d'ARNm du GHRH-R chez des rats de 12 j suivi d'une augmentation à 30 j lors de la maturation sexuelle suggérant une régulation par les hormones sexuelles (189). Cette augmentation à 30 j n'a pas été détectée dans la présente étude de l'expression du GHRH-R hypophysaire par RPA au cours du développement. En effet, les niveaux d'ARNm étaient plus élevés à 12 j qu'à 30 j et ont diminué par la suite jusqu'à 70 j. Malgré cette légère divergence, ces résultats globaux demeurent concordants avec un rôle du GHRH-R dans la croissance où les niveaux d'ARNm sont maximaux durant la période périnatale. Lorsque les niveaux d'ARNm du GHRH-R sont exprimés par hypophyse, l'importante augmentation des niveaux d'ARNm entre 3 et 30 j reflète la croissance rapide de l'hypophyse et suggère une contribution du GHRH-R à la prolifération et différenciation cellulaire des somatotropes (63, 64). Ces résultats démontrent donc une régulation tissu-spécifique de l'ARNm du GHRH-R au cours du développement.

L'étude de l'expression de l'ARNm du GHRH-R rénal au cours du vieillissement a démontré une diminution significative des niveaux d'ARNm du GHRH-R à 12, 18 et 22 mois en comparaison à ceux des rats de 2 mois pour une quantité d'ARN total fixe. Cependant la quantité totale d'ARNm du GHRH-R rénal ne s'en trouve pas modifiée puisqu'une augmentation de la taille du rein est observée. Il semblerait donc que le GHRH-R ne soit pas relié aux altérations

observées au cours du vieillissement telle que la diminution de la capacité à concentrer l'urine (317). L'expression de protéines impliquées dans la capacité à concentrer l'urine telles que l'aquaporine-1, l'aquaporine-4 et la vasopressine n'est également pas modifiée durant le vieillissement (318, 319). Il a été suggéré que la diminution de la capacité à concentrer l'urine proviendrait en partie d'une diminution de la capacité du rein à répondre à la vasopressine (320), tel qu'observé chez la souris par la diminution de la stimulation du transport du NaCl par la vasopressine dans l'anse de Henlé épaisse au cours du vieillissement (321). En effet, dans l'anse de Henlé, les niveaux d'ARNm du récepteur V2 de la vasopressine ne sont pas altérés avec l'âge cependant une diminution de la production d'AMPc a été remarquée (322). Cette diminution de la réponse à la vasopressine pourrait provenir d'une modification de la traduction de l'ARNm du récepteur V2 de la vasopressine, de mécanismes post-traductionnels ou d'une anomalie du couplage entre le récepteur et l'adénylyl cyclase. La fonctionnalité du GHRH-R rénal au cours du vieillissement serait donc à investiguer avant de conclure que celui-ci n'est pas impliqué dans des phénomènes rénaux reliés au vieillissement. Par ailleurs, une étude de Boulanger et coll. n'a pas permis de mettre en évidence des modifications de l'affinité (K_d) et de la capacité maximale (B_{max}) de liaison du I^{125} -GHRH avec l'âge à l'aide d'essais de saturation dans des homogénats de médulla de rat de 14 et 18 mois comparé à des rats de 2 mois (303). Puisque les paramètres de liaison du GHRH ne sont pas modifiés avec le vieillissement, l'activité des voies de signalisation intracellulaires suivant l'activation du récepteur serait donc intéressante à étudier afin de vérifier le rôle du GHRH-R dans des altérations telles que la diminution de la capacité à concentrer l'urine au cours du vieillissement.

Dans l'hypophyse, une régulation des deux transcrits ainsi que des paramètres de liaison est observée au cours du vieillissement. En effet, chez des rats de 18 mois, les niveaux des transcrits du 2.5 et 4 kb diminuent et augmentent d'une façon significative, respectivement (119). Cependant, les niveaux des deux transcrits combinés ne sont pas modifiés à 12 et 18 mois pour une quantité fixe d'ARN total en comparaison aux niveaux d'ARNm des rats de 70 j et 2 mois, respectivement (189, 309) contrairement au rein où une diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R est remarquée. Dans l'hypophyse, une diminution du nombre de sites de liaison à haute affinité du GHRH est observée à 8 mois, suivie d'une augmentation transitoire du nombre de sites à basse affinité à 14 mois et finalement d'une disparition du site à haute affinité à 18 mois (197). L'ensemble des résultats concernant la régulation de l'expression du GHRH-R de la médulla rénale et hypophysaire au cours du développement et du vieillissement montre une régulation tissu-spécifique suggérant un nouveau rôle pour le GHRH-R rénal.

Matsubara et coll. ont suggéré l'implication du GHRH-R dans le contrôle neuroendocrinien de l'oxygénation médullaire tel que décrit pour plusieurs hormones et neuromédiateurs comme la vasopressine, l'endothéline, les prostaglandines, l'angiotensine et la dopamine (321). Cependant cette fonction n'a pas encore été mise en évidence.

Les résultats présentés dans cette thèse conduisent à proposer des rôles potentiels du GHRH-R dans l'anse de Henlé mince ascendante. Le premier repose sur l'implication du GHRH-R dans la prolifération/spécialisation des cellules de l'anse de Henlé mince ascendante afin de participer à l'établissement de la

capacité à concentrer l'urine. Puisque la régulation de l'expression de l'ARNm du GHRH-R au cours du développement coïncide avec la maturation de la capacité à concentrer l'urine, un rôle du GHRH-R rénal peut être suggéré dans la spécialisation des cellules de l'anse de Henlé mince ascendante. Kim et coll. ont remarqué que l'anse de Henlé mince ascendante était dérivée de la partie épaisse par un mécanisme d'apoptose et que ce processus était complété chez le rat à 21 j (323). Suivant cette maturation, une augmentation de l'expression de CIC-k1 est remarquée. Puisque cette augmentation de l'expression de CIC-k1 (308) coïncide avec celle du GHRH-R, le rôle du GHRH-R rénal dans l'anse de Henlé mince ascendante pourrait être associé à la spécialisation cellulaire suite à la maturation de l'anse de Henlé mince ascendante.

Concernant le rôle du GHRH-R dans la prolifération cellulaire, des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire démontrent l'implication du GHRH-R rénal au niveau de la prolifération des cellules semi-purifiées d'anse de Henlé en culture (324). Cet effet prolifératif est du même ordre de grandeur (augmentation d'environ 1.4 fois de la prolifération cellulaire) que celui observé dans les cellules GH3 transfectées avec le GHRH-R humain où une induction du gène *c-fos*, une stimulation de MAPK et de l'activité du promoteur de la GH sont également observées suivant une stimulation au GHRH (160). Une étude de la régulation *in vivo* des niveaux d'ARNm du GHRH-R chez des rats rendus diabétiques par l'injection de streptozotocine a donc été entreprise puisque durant la progression de cette pathologie, une prolifération cellulaire rénale est remarquée (277, 285, 287, 290, 291). De plus, certains facteurs de l'axe somatotrope rénal, tels que le récepteur de la GH et l'IGF-I, sont également modifiés au cours de cette

pathologie. Une augmentation précoce de l'ARNm du GH-R et de l'ARNm de l'IGF-I et de sa protéine, suite à l'induction du diabète, a été rapportée, dans certains cas cette augmentation précède l'hypertrophie rénale suggérant un rôle prolifératif de ces composantes hormonales lors du diabète (277, 285, 287, 288, 290). Deux jours suivant l'induction du diabète, une diminution significative des niveaux d'ARNm du GHRH-R rénal a été observée. À 21 et 60 j suivant l'induction du diabète, les niveaux d'ARNm du GHRH-R sont partiellement restaurés ce qui peut être indicatif d'un état prolifératif. Cet effet est moins apparent lorsque les résultats sont représentés par une concentration d'ARN total dans la médulla entière suggérant que d'autres populations cellulaires puissent augmenter au cours du diabète. Le GHRH-R hypophysaire exerce son effet sur la prolifération cellulaire *via* les voies de signalisation AMPc-PKA et MAPKinase (59, 158, 159). L'utilisation de la voie intracellulaire impliquant la PKC a également été suggérée suite à l'activation du GHRH-R hypophysaire (59, 325). Puisque ces trois voies de signalisation intracellulaires sont également présentes dans le rein et plus particulièrement l'AMPc-PKA et la PKC ont été observées dans HL mince ascendante (326-328), le rôle du GHRH-R rénal dans la prolifération de ces cellules pourrait impliquer l'une ou plusieurs d'entre elles.

L'étude de l'expression de l'ARNm du GHRH-R hypophysaire au cours du diabète a démontré une régulation différentielle selon la durée de la pathologie. L'expression du transcrite de 2.5 kb est augmenté à 2 et 21 j suivant l'induction du diabète et demeure inchangée à 60 j. Puisque le contenu en GHRH hypothalamique augmente 2 et 4 j suivant l'administration de streptozotocine (329) pour ensuite diminuer (329, 330), le patron d'expression du transcrite de 2.5 kb du GHRH-R semble correspondre à une régulation positive par le GHRH dans les

stades précoces du diabète, suivi d'une régulation à la baisse. Lorsque les résultats sont représentés par une concentration d'ARN total dans la médulla entière, la réduction de la taille de l'hypophyse antérieure contribue à la diminution du contenu en ARNm du GHRH-R. Lors d'un diabète à long terme, les niveaux d'ARNm du GHRH-R sont régulés d'une façon similaire à ceux observés au cours du vieillissement suggérant que des facteurs hormonaux et métaboliques autres que le GHRH hypothalamique peuvent influencer l'expression du GHRH-R lors du diabète tel qu'observé lors du vieillissement (197). Lors d'un diabète à long terme, l'élévation du ratio 4/2.5 kb, qui a été associée dans l'hypophyse à une diminution significative de l'affinité au GHRH (Kd) et de la capacité maximale (Bmax) du GHRH-R, particulièrement lors du vieillissement (119), suggère que la liaison du GHRH à son récepteur sera également perturbée dans les états diabétiques ce qui permettrait d'expliquer la diminution de l'habileté des somatotropes à sécréter (331) et synthétiser la GH. Tel qu'observé lors du développement et du vieillissement, la régulation de l'ARNm du GHRH-R rénal au cours du diabète diffère de celle du GHRH-R hypophysaire. Ce phénomène est également observé au niveau du GH-R et de l'IGF-I. En effet, l'ARNm du GH-R augmente dans le rein mais diminue dans le cœur et le foie suite à l'induction du diabète (285). Contrairement au rein, les niveaux d'ARNm d'IGF-I du foie sont réduits chez les rats diabétiques tandis que ceux du poumon ne sont pas altérés dans ces conditions (290, 291). Ces résultats démontrent l'existence d'une régulation tissu-spécifique de plusieurs composantes de l'axe GH/IGF-I.

Le deuxième rôle potentiel du GHRH-R rénal propose l'implication de ce récepteur dans le transport du chlore considérant sa localisation dans l'anse de

Henlé mince ascendante. D'autres composantes rénales de l'axe somatotrophe, telles que la GH et l'IGF-I, ont également été impliquées dans le transport ionique (332, 333). L'hormone de croissance hypophysaire permet d'augmenter la réabsorption de sodium chez l'humain. Cet effet est complètement aboli par l'ajout d'un inhibiteur de la transcription, l'actinomycine D, suggérant un effet de la GH sur l'expression de gènes de transporteurs ioniques (334). Il a également été démontré que l'activité du transporteur Na-K ATPase dans des homogénats de rein était augmentée à la suite d'une stimulation par la GH (334). L'effet de l'IGF-I sur le transport du sodium a été étudié dans des cellules A6 (distal tubular epithelium-like cells) en culture (333) où il a été montré que ce facteur de croissance augmente de trois fois l'activité des canaux sodiques au cours des 5 premières minutes d'incubation. Cet effet est associé à l'autophosphorylation de la sous-unité β et la phosphorylation de l'IRS-1 (insuline receptor substrate-1) de l'IGF-I-R, suggérant que l'augmentation de la conductance des canaux sodiques est relié à l'activation de l'IGF-I-R (333).

Afin de vérifier l'implication du GHRH-R dans le transport ionique, nous avons étudié la régulation de l'expression de l'ARNm du GHRH-R rénal lors de la modulation *in vivo* de l'équilibre ionique et hydrique, c'est-à-dire suite à une diète riche en sel et d'une restriction hydrique. Les résultats ont démontré une régulation différentielle de l'expression de l'ARNm du GHRH-R selon la durée de la diète riche en sel. En effet, une diète de 2, 7 et 14 j diminue, augmente et n'a pas d'effet sur les niveaux d'ARNm du GHRH-R rénal, respectivement. L'augmentation de l'osmolarité sanguine par une diète riche en sel provoque la diminution de la réabsorption de sel au niveau rénal, tel qu'observé par la diminution de l'activité du

transporteur NaKATPase et de l'antiporteur Na-H dans le tubule contourné proximal (335, 336). Cette régulation différentielle de l'expression de l'ARNm du GHRH-R pourrait participer au processus adaptatif de l'anse de Henlé mince, afin de compenser pour la perte de l'homéostasie causée par une augmentation de l'absorption de sel. La diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R suivant une diète riche en sel de 2 j peut représenter la réponse précoce à l'augmentation de l'osmolarité sanguine. Considérant un rôle du GHRH-R dans le transport ionique via la régulation de l'expression d'un canal au chlore, une diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R pourrait correspondre à une régulation négative de l'expression de ce canal. Suite à une diète de 7 et 14 j, l'augmentation suivie d'une normalisation de l'expression de l'ARNm du GHRH-R pourrait être reliée à des perturbations systémiques et/ou rénales de paramètres biochimiques et/ou hormonaux, dues à l'aggravation de la condition pathologie. De plus, il a récemment été rapporté qu'une diète riche en sel d'une durée de 7 jours, chez le rat Sprague Dawley, affecte positivement ou négativement la régulation de l'expression d'au moins 60 gènes rénaux. Ces différents gènes codent entre autres pour des canaux ioniques, des molécules impliquées dans les voies de signalisation, des facteurs de transcription ainsi que des enzymes. Le rôle des produits de ces différents gènes sur l'expression du GHRH-R rénal demeure cependant à être étudié (337). L'absence de régulation de l'expression de l'ARNm du GHRH-R suivant une restriction hydrique de 3 j renforce les résultats de la localisation du GHRH-R dans l'anse de Henlé mince ascendante et suggère l'implication du GHRH-R dans une fonction rénale spécifique telle que le transport du chlore qui constitue une fonction majeure de ce segment du néphron.

Au niveau de l'hypophyse antérieure, une diète riche en sel de 2, 7 ou 14 j et une restriction hydrique ne modifie pas ou augmente les niveaux combinés des deux transcrits du GHRH-R, respectivement, suggérant une régulation tissu-spécifique du GHRH-R en comparaison aux résultats obtenus dans la médulla rénale. Cependant, l'étude des transcrits individuels et des ratios du GHRH-R suivant une diète riche en sel démontre une régulation différentielle selon la durée de la diète. Le transcrit de 4kb diminue après 2 j alors que le transcrit de 4kb et le ratio 4/2.5kb augmentent, bien que le transcrit de 2.5 kb diminue après 7 j lorsque les résultats sont rapportés par une quantité d'ARN total fixe. Des résultats similaires sont obtenus pour le transcrit de 4kb et le ratio 4/2.5kb après 7 j lorsque les résultats sont présentés par une concentration d'ARN total dans la médulla entière. Ces résultats représentent la première étude sur la modulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire par une diète riche en sel. Au cours du vieillissement, l'augmentation du ratio 4/2.5kb est associée à une diminution significative de l'affinité (K_d) au GHRH et de la capacité maximale (B_{max}) du GHRH-R (119). Cette régulation à la hausse du ratio 4/2.5kb observée dans l'hypophyse antérieure, suivant une diète riche en sel, pourrait être indicateur d'une modification des paramètres de liaison du GHRH. Suite à une restriction hydrique de 3 j, une augmentation significative des transcrits de 2.5 kb, 4 kb et 4+2.5 kb du GHRH-R est observée par rapport aux rats témoins pour une quantité fixe d'ARN total. Lors d'une restriction hydrique, la vasopressine plasmatique augmente afin de maximiser la réabsorption de l'eau (338). Un effet indirect de la vasopressine sur l'expression de l'ARNm du GHRH-R peut être suggéré. Des sites de liaison à la vasopressine ont été observés au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus, site de synthèse du facteur de libération de l'hormone de

croissance (339), suggérant que la vasopressine puisse agir indirectement sur la régulation de l'expression du GHRH-R hypophysaire en régulant la synthèse du GHRH hypothalamique. Les résultats obtenus suite à une diète riche en sel et une restriction hydrique concernant le GHRH-R rénal et hypophysaire démontre, une fois de plus, une régulation tissu-spécifique et renforce l'hypothèse d'un nouveau rôle pour le GHRH-R dans le rein.

La régulation par le GHRH-R de la perméabilité du chlore dans l'anse de Henlé mince ascendante pourrait être expliquée par des mécanismes indirects basés sur ceux observés à la suite de l'activation du récepteur hypophysaire. La modulation de la perméabilité de l'anse de Henlé mince ascendante au chlore implique le calcium (340, 341). En effet, Kondo et coll. ont observé la disparition de la perméabilité au chlore dans l'anse de Henlé mince ascendante chez le hamster, lorsque les concentrations intracellulaires de calcium diminuent (340). Cette régulation semble impliqué CIC-k1 puisque ce canal, exprimé dans des ovocytes de *Xenopus*, est activé par le calcium extracellulaire (341). Puisque l'activation du GHRH-R hypophysaire permet une ouverture de canaux ioniques membranaires conduisant à une entrée de calcium extracellulaire, le GHRH-R rénal pourrait réguler le transport du chlore en augmentant l'entrée de calcium et moduler à court terme la perméabilité de l'anse de Henlé mince ascendante (141). Les résultats d'immunolocalisation du GHRH-R dans les cellules purifiées d'anse de Henlé mince ascendante ont révélé une distribution homogène du GHRH-R, au niveau de la membrane cytoplasmique. La localisation cellulaire du canal CIC-k1 au niveau de la membrane apicale et basolatérale (213) étant similaire à celle du GHRH-R, elle supporterait un rôle du GHRH-R dans la modulation du transport du

chlore. Toutefois, ces résultats seront complétés par une étude de localisation ultrastructurale, en utilisation un environnement cytoarchitectural natif. En effet, il ne peut être totalement exclus que la dispersion cellulaire puisse avoir un impact sur la localisation membranaire de GHRH-R.

Un second mécanisme de régulation du transport du chlore par le GHRH-R pourrait impliquer une modulation à long terme de l'expression du canal au chlore CIC-k1. Il a été démontré que la vasopressine provoquait la réabsorption du chlore au niveau de l'anse de Henlé mince chez le hamster par l'augmentation de la production de l'AMPc et l'activation de la protéine kinase A (327). Le même phénomène permet une régulation à long terme de l'aquaporine-2 par la vasopressine dans les cellules du tube collecteur (242). En effet, la vasopressine permettrait, par l'activation du facteur de transcription CREB, l'augmentation de l'expression du gène de l'aquaporine-2 (242). Un phénomène similaire est observé dans les cellules somatotropes où l'activation du GHRH-R conduit à l'augmentation de l'expression de la GH et du GHRH-R *via* le facteur de transcription CREB. Au niveau de l'anse de Henlé mince ascendante, un mécanisme similaire pourrait être envisagé afin d'augmenter la transcription du gène du transporteur, CIC-k1. Un fragment d'environ 2.5 kb de la région 5' du promoteur du transporteur, CIC-k1, a été isolé (342). Aucun site de liaison pour le facteur de transcription CREB n'a été identifié cependant la région isolée ne correspond peut-être pas à la totalité du promoteur ou l'action du GHRH sur la transcription pourrait faire intervenir plusieurs autres facteurs de transcription. La régulation de l'expression de l'ARNm du GHRH-R dans des cellules d'anse de Henlé semi-purifiées, suite à une stimulation au GHRH démontre la présence, comme dans l'hypophyse, d'un

mécanisme fonctionnel de la régulation de l'expression du GHRH-R supportant l'hypothèse d'un mécanisme similaire qui puisse permettre la régulation de l'expression du canal au chlore, ClC-k1.

Plusieurs des mécanismes proposés impliquent la voie de signalisation intracellulaire adénylyl cyclase/AMPc/protéine kinase A. Bien que la voie de signalisation du GHRH-R rénal n'ait pas encore été identifiée, des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire suggèrent l'implication de l'AMPc (324).

La présence d'un GHRH-R fonctionnel dans la partie mince ascendante de l'anse de Henlé peut suggérer l'implication de ce récepteur dans une cascade cellulaire similaire à celle de l'axe somatotrope conduisant à une action biologique par la liaison de l'IGF-I à son récepteur. En effet, le néphron comporte plusieurs composantes de l'axe somatotrope. Plus particulièrement, l'anse de Henlé mince exprime l'IGF-I tandis que la partie épaisse constitue la seule partie du néphron où le récepteur de la GH, l'IGF-I et son récepteur sont exprimés suggérant que la GH puisse agir *via* la synthèse d'IGF-I local et permettre une action autocrine ou paracrine en activant son récepteur (251, 253). Cependant, la synthèse de la GH par le néphron n'ayant jamais été mise en évidence, une action indépendante du GHRH-R des autres composantes de l'axe somatotrope rénal est privilégiée tel qu'observé pour la GH dans les tubules proximaux canins, lors de la gluconéogénèse (250). Puisque l'IGF-I est synthétisé par l'anse de Henlé mince, l'activation du GHRH-R pourrait permettre une augmentation de la synthèse de l'IGF-I, celui-ci pouvant agir d'une façon paracrine sur un segment du néphron

synthétisant l'IGF-I-R. Un tel mécanisme demeure toutefois à être exploré. L'ensemble de ces résultats nous amène donc à proposer un rôle du GHRH-R indépendant de l'IGF-1 dans le rein, suite aux observations effectuées dans l'hypophyse où l'activation du récepteur permet la modulation du transport ionique ainsi que la régulation de l'expression de la GH, deux systèmes permettant d'expliquer le mécanisme des hypothèses avancées concernant le transport ionique.

4.0 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans cette thèse représentent la première caractérisation du récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance. Ils ont permis de déterminer la localisation spécifique du GHRH-R rénal dans l'anse de Henlé mince ascendante ainsi que sa fonctionnalité dans ce type cellulaire. La régulation spécifique du GHRH-R dans la médulla rénale et l'hypophyse dans toutes les conditions étudiées permet de proposer un nouveau rôle du GHRH-R dans le rein. Considérant sa localisation et sa régulation au cours du développement et du diabète, un rôle du GHRH-R dans la prolifération/spécialisation cellulaire peut être suggéré plus spécifiquement. L'effet d'une diète riche en sel ou d'une restriction hydrique a permis l'étude *in vivo* de la régulation de l'expression du GHRH-R et suggère un rôle du GHRH-R au niveau de la modulation de l'activité ou de la synthèse d'un transporteur au chlore, CIC-k1. D'autres études seront requises afin de déterminer, par des méthodes plus directes, le rôle précis du GHRH-R dans l'anse de Henlé mince ascendante.

Afin de vérifier le rôle du GHRH-R sur la prolifération/spécialisation de l'anse de Henlé mince, l'action du système GHRH-GHRH-R sur la formation de ce segment du néphron pourrait être étudiée. Il a été démontré que la partie mince ascendante de l'anse de Henlé provenait d'un segment de la partie épaisse soumis au phénomène d'apoptose. Suite à la stimulation de cellules purifiées d'anse de Henlé par le GHRH, la spécialisation des cellules de l'anse de Henlé mince serait évaluée par immunomarquage à l'aide d'un marqueur cellulaire spécifique à HL mince ascendante, CIC-k1. Cette étude pourrait être effectuée chez des rats de 3 j, lors du début de la formation de la partie mince ascendante de l'anse de Henlé,

et comparé à des rats de 2 mois où la maturation de la partie mince ascendante de l'anse de Henlé est terminée.

Afin de vérifier le rôle du GHRH-R dans le transport ionique, l'étude de l'action à court terme du GHRH-R sur l'ouverture des canaux au chlore via l'activation de canaux calciques pourrait être vérifiée *in vitro* à l'aide d'études de flux ionique en utilisant des cellules d'anse de Henlé mince en présence d'indicateurs fluorescents pour le calcium tel que le Fura-2 AM. L'étude de l'implication du GHRH-R dans la perméabilité au chlore pourrait également mener à l'étude de l'interaction entre le GHRH-R et CIC-k1. Cet objectif pourrait être atteint en utilisant une approche d'immunoprécipitation, suivi de la détection par immunobuvardage Western des deux protéines.

Concernant l'implication à long terme du GHRH-R dans le transport ionique de la partie ascendante mince, la régulation *in vitro* de l'expression de CIC-k1 pourrait être évaluée après stimulation au GHRH de cellules d'anse de Henlé mince et analysée par immunocytochimie ou buvardage Western. La spécificité de l'effet devra, par la suite, être documentée par l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes du GHRH.

Basé sur les résultats présentés dans cette thèse, ces études permettront de déterminer avec certitude le rôle du GHRH-R au niveau de la prolifération/spécialisation cellulaire et du transport du chlore de l'anse de Henlé mince ascendante.

5.0 BIBLIOGRAPHIE

1. **Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB** 1982 Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 218:585-587
2. **Rivier J, Spiess J, Thorner M, Vale W** 1982 Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature* 300:276-278
3. **Bohlen P, Brazeau P, Bloch B, Ling N, Gaillard R, Guillemin R** 1983 Human hypothalamic growth hormone releasing factor (GRF): evidence for two forms identical to tumor derived GRF-44-NH₂ and GRF-40. *Biochem Biophys Res Commun* 114:930-936
4. **Ling N, Esch F, Bohlen P, Brazeau P, Wehrenberg WB, Guillemin R** 1984 Isolation, primary structure, and synthesis of human hypothalamic somatocrinin: growth hormone-releasing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:4302-4306
5. **Lin HD, Bollinger J, Ling N, Reichlin S** 1984 Immunoreactive growth hormone-releasing factor in human stalk median eminence. *J Clin Endocrinol Metab* 58:1197-1199
6. **Frohman MA, Downs TR, Chomczynski P, Frohman LA** 1989 Cloning and characterization of mouse growth hormone-releasing hormone (GRH) complementary DNA: increased GRH messenger RNA levels in the growth hormone-deficient lit/lit mouse. *Mol Endocrinol* 3:1529-1536

7. **Suhr ST, Rahal JO, Mayo KE** 1989 Mouse growth-hormone-releasing hormone: precursor structure and expression in brain and placenta. *Mol Endocrinol* 3:1693-1700
8. **Mayo KE, Cerelli GM, Lebo RV, Bruce BD, Rosenfeld MG, Evans RM** 1985 Gene encoding human growth hormone-releasing factor precursor: structure, sequence, and chromosomal assignment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:63-67
9. **Spiess J, Rivier J, Vale W** 1983 Characterization of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature* 303:532-535
10. **Bohlen P, Esch F, Brazeau P, Ling N, Guillemin R** 1983 Isolation and characterization of the porcine hypothalamic growth hormone releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 116:726-734
11. **Esch F, Bohlen P, Ling N, Brazeau P, Guillemin R** 1983 Isolation and characterization of the bovine hypothalamic growth hormone releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 117:772-779
12. **Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB, Guillemin R** 1984 Growth hormone-releasing factor from ovine and caprine hypothalamus: isolation, sequence analysis and total synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 125:606-614
13. **Campbell RM, Scanes CG** 1992 Evolution of the growth hormone-releasing factor (GRF) family of peptides. *Growth Regul* 2:175-191

14. **Riddell DC, Mallonee R, Phillips JA, Parks JS, Sexton LA, Hamerton JL** 1985 Chromosomal assignment of human sequences encoding arginine vasopressin- neurophysin II and growth hormone releasing factor. *Somat Cell Mol Genet* 11:189-195
15. **Godfrey P, Rahal JO, Beamer WG, Copeland NG, Jenkins NA, Mayo KE** 1993 GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nat Genet* 4:227-232
16. **Mizobuchi M, Frohman MA, Downs TR, Frohman LA** 1991 Tissue-specific transcription initiation and effects of growth hormone (GH) deficiency on the regulation of mouse and rat GH-releasing hormone gene in hypothalamus and placenta. *Mol Endocrinol* 5:476-484
17. **Gonzalez-Crespo S, Boronat A** 1991 Expression of the rat growth hormone-releasing hormone gene in placenta is directed by an alternative promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8749-8753
18. **Mayo KE, Godfrey PA, Suhr ST, Kulik DJ, Rahal JO** 1995 Growth hormone-releasing hormone: synthesis and signaling. *Recent Prog Horm Res* 50:35-73
19. **Brar AK, Downs TR, Heimer EP, Felix AM, Frohman LA** 1991 Biosynthesis of human growth hormone-releasing hormone (hGRH) in the pituitary of hGRH transgenic mice. *Endocrinology* 129:3274-3280

20. **Frohman LA, Downs TR, Kashio Y, Brinster RL** 1990 Tissue distribution and molecular heterogeneity of human growth hormone-releasing factor in the transgenic mouse. *Endocrinology* 127:2149-2156
21. **Gaudreau P, Boulanger L, Abribat T** 1992 Affinity of human growth hormone-releasing factor (1-29)NH₂ analogues for GRF binding sites in rat adenopituitary. *J Med Chem* 35:1864-1869
22. **Lefrancois L, Gaudreau P** 1994 Identification of receptor-binding pharmacophores of growth-hormone-releasing factor in rat adenopituitary. *Neuroendocrinology* 59:363-370
23. **Andreasen T, Helmgaard L, Gaudreau P, Andersen PH** 1996 Growth hormone-releasing substances. In: Ranke MB, Christiansen JS (eds). *The complexity of endocrine systems*. Mannheim:1-27
24. **Chomczynski P, Downs TR, Frohman LA** 1988 Feedback regulation of growth hormone (GH)-releasing hormone gene expression by GH in rat hypothalamus. *Mol Endocrinol* 2:236-241
25. **Sato M, Frohman LA** 1993 Differential effects of central and peripheral administration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor on hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin gene expression in GH-deficient dwarf rats. *Endocrinology* 133:793-799
26. **Senaris RM, Lago F, Coya R, Pineda J, Dieguez C** 1996 Regulation of hypothalamic somatostatin, growth hormone-releasing hormone, and growth

hormone receptor messenger ribonucleic acid by glucocorticoids. *Endocrinology* 137:5236-5241

27. **Delitala G, Tomasi P, Viridis R** 1988 Neuroendocrine regulation of human growth hormone secretion. Diagnostic and clinical applications. *J Endocrinol Invest* 11:441-462
28. **Miki N, Ono M, Hizuka N, Aoki T, Demura H** 1992 Thyroid hormone modulation of the hypothalamic growth hormone (GH)-releasing factor-pituitary GH axis in the rat. *J Clin Invest* 90:113-120
29. **Downs TR, Chomczynski P, Frohman LA** 1990 Effects of thyroid hormone deficiency and replacement on rat hypothalamic growth hormone (GH)-releasing hormone gene expression in vivo are mediated by GH. *Mol Endocrinol* 4:402-408
30. **Shioda S, Kohara H, Nakai Y** 1987 TRH axon terminals in synapsis with GRF neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus as revealed by double labeling immunocytochemistry. *Brain Res* 402:355-358
31. **Daikoku S, Hisano S, Kawano H, Chikamori-Aoyama M, Kagotani Y, Zhang RJ, Chihara K** 1988 Ultrastructural evidence for neuronal regulation of growth hormone secretion. *Neuroendocrinology* 47:405-415
32. **Sato A, Shioda S, Nakai Y** 1989 Catecholaminergic innervation of GRF-containing neurons in the rat hypothalamus revealed by electron-microscopic cytochemistry. *Cell Tissue Res* 258:31-34

33. **Liposits Z, Merchenthaler I, Paul WK, Flerko B** 1988 Synaptic communication between somatostatinergic axons and growth hormone-releasing factor (GRF) synthesizing neurons in the arcuate nucleus of the rat. *Histochemistry* 89:247-252
34. **Willoughby JO, Brogan M, Kapoor R** 1989 Hypothalamic interconnections of somatostatin and growth hormone releasing factor neurons. *Neuroendocrinology* 50:584-591
35. **Beauvillain JC, Tramu G, Mazzuca M** 1987 Fine structural studies of growth-hormone-releasing-factor (GRF)- immunoreactive neurons and their synaptic connections in the guinea pig arcuate nucleus. *J Comp Neurol* 255:110-123
36. **Horvath S, Palkovits M** 1988 Synaptic interconnections among growth hormone-releasing hormone (GHRH)- containing neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 48:471-476
37. **Argente J, Chowen JA, Zeitler P, Clifton DK, Steiner RA** 1991 Sexual dimorphism of growth hormone-releasing hormone and somatostatin gene expression in the hypothalamus of the rat during development. *Endocrinology* 128:2369-2375
38. **Zeitler P, Argente J, Chowen-Breed JA, Clifton DK, Steiner RA** 1990 Growth hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid in the hypothalamus of the adult male rat is increased by testosterone. *Endocrinology* 127:1362-1368

39. **Senaris RM, Lago F, Lewis MD, Dominguez F, Scanlon MF, Dieguez C** 1992 Differential effects of in vivo estrogen administration on hypothalamic growth hormone releasing hormone and somatostatin gene expression. *Neurosci Lett* 141:123-126
40. **Olchovsky D, Bruno JF, Wood TL, Gelato MC, Leidy JW, Jr., Gilbert JM, Jr., Berelowitz M** 1990 Altered pituitary growth hormone (GH) regulation in streptozotocin- diabetic rats: a combined defect of hypothalamic somatostatin and GH- releasing factor. *Endocrinology* 126:53-61
41. **Maccario M, Grottoli S, Procopio M, Oleandri SE, Rossetto R, Gauna C, Arvat E, Ghigo E** 2000 The GH/IGF-I axis in obesity: influence of neuro-endocrine and metabolic factors. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2:S96-S99
42. **Brogan RS, Fife SK, Conley LK, Giustina A, Wehrenberg WB** 1997 Effects of food deprivation on the GH axis: immunocytochemical and molecular analysis. *Neuroendocrinology* 65:129-135
43. **Bruno JF, Olchovsky D, White JD, Leidy JW, Song J, Berelowitz M** 1990 Influence of food deprivation in the rat on hypothalamic expression of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 127:2111-2116
44. **Muller EE, Locatelli V, Cocchi D** 1999 Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev* 79:511-607

45. **Petersenn S, Schulte HM** 2000 Structure and function of the growth-hormone-releasing hormone receptor. *Vitam Horm* 59:35-69
46. **Barinaga M, Yamonoto G, Rivier C, Vale W, Evans R, Rosenfeld MG** 1983 Transcriptional regulation of growth hormone gene expression by growth hormone-releasing factor. *Nature* 306:84-85
47. **Barinaga M, Bilezikjian LM, Vale WW, Rosenfeld MG, Evans RM** 1985 Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 314:279-281
48. **Tannenbaum GS, Ling N** 1984 The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology* 115:1952-1957
49. **Sarret P, Nouel D, Dal Farra C, Vincent JP, Beaudet A, Mazella J** 1999 Receptor-mediated internalization is critical for the inhibition of the expression of growth hormone by somatostatin in the pituitary cell line AtT-20. *J Biol Chem* 274:19294-19300
50. **Wabitsch M, Hauner H, Heinze E, Teller WM** 1995 The role of growth hormone/insulin-like growth factors in adipocyte differentiation. *Metabolism* 44:45-49
51. **Goodman HM** 1968 Growth hormone and the metabolism of carbohydrate and lipid in adipose tissue. *Ann N Y Acad Sci* 148:419-440

52. **Albertsson-Wirkland K, Eden S, Isaksson O** 1979 In vitro effects of growth hormone on protein synthesis and amino acid transport in the rat diaphragm after acute hypophysectomy. *Acta Physiol Scand* 105:215-221
53. **Schwander JC, Hauri C, Zapf J, Froesch ER** 1983 Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocrinology* 113:297-305
54. **D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE** 1984 Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:935-939
55. **D'Ercole AJ, Hill DJ, Strain AJ, Underwood LE** 1986 Tissue and plasma somatomedin-C/insulin-like growth factor I concentrations in the human fetus during the first half of gestation. *Pediatr Res* 20:253-255
56. **Isgaard J, Moller C, Isaksson OG, Nilsson A, Mathews LS, Norstedt G** Regulation of insulin-like growth factor messenger ribonucleic acid in rat growth plate by growth hormone.
57. **Peter MA, Winterhalter KH, Boni-Schnetzler M, Froesch ER, Zapf J** 1993 Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by growth hormone in rat white adipose tissue. *Endocrinology* 133:2624-2631

58. **Thorner MO, Perryman RL, Cronin MJ, Rogol AD, Draznin M, Johanson A, Vale W, Horvath E, Kovacs K** 1982 Somatotroph hyperplasia. Successful treatment of acromegaly by removal of a pancreatic islet tumor secreting a growth hormone-releasing factor. *J Clin Invest* 70:965-977
59. **Frohman LA, Jansson JO** 1986 Growth hormone-releasing hormone. *Endocr Rev* 7:223-253
60. **Frohman LA, Szabo M** 1981 Ectopic production of growth hormone-releasing factor by carcinoid and pancreatic islet tumors associated with acromegaly. *Prog Clin Biol Res* 74:259-271
61. **Hammer RE, Brinster RL, Rosenfeld MG, Evans RM, Mayo KE** 1985 Expression of human growth hormone-releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth. *Nature* 315:413-416
62. **Stefaneanu L, Kovacs K, Horvath E, Asa SL, Losinski NE, Billestrup N, Price J, Vale W** 1989 Adenohypophysial changes in mice transgenic for human growth hormone-releasing factor: a histological, immunocytochemical, and electron microscopic investigation. *Endocrinology* 125:2710-2718
63. **Billestrup N, Swanson LW, Vale W** 1986 Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:6854-6857

64. **Billestrup N, Mitchell RL, Vale W, Verma IM** 1987 Growth hormone-releasing factor induces c-fos expression in cultured primary pituitary cells. *Mol Endocrinol* 1:300-305
65. **Meister B, Ceccatelli S, Hokfelt T, Anden NE, Anden M, Theodorsson E** 1989 Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. *Exp Brain Res* 76:343-368
66. **Ciofi P, Croix D, Tramu G** 1988 Colocalization of GHRF and NPY immunoreactivities in neurons of the infundibular area of the human brain. *Neuroendocrinology* 47:469-472
67. **Sawchenko PE, Swanson LW, Rivier J, Vale WW** 1985 The distribution of growth-hormone-releasing factor (GRF) immunoreactivity in the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study using antisera directed against rat hypothalamic GRF. *J Comp Neurol* 237:100-115
68. **Martin JB** 1973 The role of hypothalamic and extrahypothalamic structures in the control of growth hormone secretion. In: Raiti S (ed). *Advances in human growth hormone research*. Bethesda:223-249
69. **Luedecke D, Mueller D, Patino C** 1976 Effects of stereotaxis in the human hypothalamus and limbic system on ACTH and GH secretion. *Proc Int Congr Endocrinol 5th p.272:Hamburg Germany-272*
70. **Cataldi M, Magnan E, Guillaume V, Dutour A, Sauze N, Mazzocchi L, Conte-Devolx B, Oliver C** 1994 Acute stress stimulates secretion of GHRH

and somatostatin into hypophysial portal blood of conscious sheep. *Neurosci Lett* 178:103-106

71. **Dickson PR, Vaccarino FJ** 1990 Characterization of feeding behavior induced by central injection of GRF. *Am J Physiol* 259:R651-R657
72. **Feifel D, Vaccarino FJ** 1989 Feeding effects of growth hormone-releasing factor in rats are photoperiod sensitive. *Behav Neurosci* 103:824-830
73. **Vaccarino FJ, Feifel D, Rivier J, Vale W** 1991 Antagonism of central growth hormone-releasing factor activity selectively attenuates dark-onset feeding in rats. *J Neurosci* 11:3924-3927
74. **Dickson PR, Feifel D, Vaccarino FJ** 1995 Blockade of endogenous GRF at dark onset selectively suppresses protein intake. *Peptides* 16:7-9
75. **Ehlers CL, Reed TK, Henriksen SJ** 1986 Effects of corticotropin-releasing factor and growth hormone-releasing factor on sleep and activity in rats. *Neuroendocrinology* 42:467-474
76. **Obal F, Jr., Alfoldi P, Cady AB, Johannsen L, Sary G, Krueger JM** 1988 Growth hormone-releasing factor enhances sleep in rats and rabbits. *Am J Physiol* 255:R310-R316
77. **Obal F, Jr., Payne L, Opp M, Alfoldi P, Kapas L, Krueger JM** 1992 Growth hormone-releasing hormone antibodies suppress sleep and prevent enhancement of sleep after sleep deprivation. *Am J Physiol* 263:R1078-R1085

78. **Zhang J, Chen Z, Taishi P, Obal F, Jr., Fang J, Krueger JM** 1998 Sleep deprivation increases rat hypothalamic growth hormone-releasing hormone mRNA. *Am J Physiol* 275:R1755-R1761
79. **Zhang J, Obal F, Jr., Zheng T, Fang J, Taishi P, Krueger JM** 1999 Intrapreoptic microinjection of GHRH or its antagonist alters sleep in rats. *J Neurosci* 19:2187-2194
80. **Nistico G, De Sarro GB, Bagetta G, Muller EE** 1987 Behavioural and electrocortical spectrum power effects of growth hormone releasing factor in rats. *Neuropharmacology* 26:75-78
81. **Obal F, Jr., Payne L, Kapas L, Opp M, Krueger JM** 1991 Inhibition of growth hormone-releasing factor suppresses both sleep and growth hormone secretion in the rat. *Brain Res* 557:149-153
82. **Margioris AN, Brockmann G, Bohler HC, Jr., Grino M, Vamvakopoulos N, Chrousos GP** 1990 Expression and localization of growth hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid in rat placenta: in vitro secretion and regulation of its peptide product. *Endocrinology* 126:151-158
83. **Berry SA, Srivastava CH, Rubin LR, Phipps WR, Pescovitz OH** 1992 Growth hormone-releasing hormone-like messenger ribonucleic acid and immunoreactive peptide are present in human testis and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 75:281-284

84. **Pescovitz OH, Johnson NB, Berry SA** 1991 Ontogeny of growth hormone releasing hormone and insulin-like growth factors-I and -II messenger RNA in rat placenta. *Pediatr Res* 29:510-516
85. **Hochberg Z, Bick T, Perlman R** 1988 Two pathways of placental lactogen secretion by cultured human trophoblast. *Biochem Med Metab Biol* 39:111-116
86. **Mayo KE, Miller TL, DeAlmeida V, Zheng J, Godfrey PA** 1996 The growth-hormone-releasing hormone receptor: signal transduction, gene expression, and physiological function in growth regulation. *Ann N Y Acad Sci* 805:184-203
87. **Bagnato A, Moretti C, Ohnishi J, Frajese G, Catt KJ** 1992 Expression of the growth hormone-releasing hormone gene and its peptide product in the rat ovary. *Endocrinology* 130:1097-1102
88. **Berry SA, Pescovitz OH** 1988 Identification of a rat GHRH-like substance and its messenger RNA in rat testis. *Endocrinology* 123:661-663
89. **Ciampani T, Fabbri A, Isidori A, Dufau ML** 1992 Growth hormone-releasing hormone is produced by rat Leydig cell in culture and acts as a positive regulator of Leydig cell function. *Endocrinology* 131:2785-2792
90. **Moretti C, Bagnato A, Solan N, Frajese G, Catt KJ** 1990 Receptor-mediated actions of growth hormone releasing factor on granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 127:2117-2126

91. **Fabbri A, Ciocca DR, Ciampani T, Wang J, Dufau ML** 1995 Growth hormone-releasing hormone in testicular interstitial and germ cells: potential paracrine modulation of follicle-stimulating hormone action on Sertoli cell function. *Endocrinology* 136:2303-2308
92. **Spicer LJ, Langhout DJ, Alpizar E, Williams SK, Campbell RM, Mowles TF, Enright WJ** 1992 Effects of growth hormone-releasing factor and vasoactive intestinal peptide on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 83:73-78
93. **Srivastava CH, Collard MW, Rothrock JK, Peredo MJ, Berry SA, Pescovitz OH** 1993 Germ cell localization of a testicular growth hormone-releasing hormone-like factor. *Endocrinology* 133:83-89
94. **Srivastava CH, Breyer PR, Rothrock JK, Peredo MJ, Pescovitz OH** 1993 A new target for growth hormone releasing-hormone action in rat: the Sertoli cell. *Endocrinology* 133:1478-1481
95. **Pescovitz OH, Berry SA, Laudon M, Ben Jonathan N, Martin-Myers A, Hsu SM, Lambros TJ, Felix AM** 1990 Localization and growth hormone (GH)-releasing activity of rat testicular GH-releasing hormone-like peptide. *Endocrinology* 127:2336-2342
96. **Matsubara S, Sato M, Mizobuchi M, Niimi M, Takahara J** 1995 Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology* 136:4147-4150

97. **Bosman FT, Van Assche C, Nieuwenhuyzen Kruseman AC, Jackson S, Lowry PJ** 1984 Growth hormone releasing factor (GRF) immunoreactivity in human and rat gastrointestinal tract and pancreas. *J Histochem Cytochem* 32:1139-1144
98. **Bruhn TO, Mason RT, Vale WW** 1985 Presence of growth hormone-releasing factor-like immunoreactivity in rat duodenum. *Endocrinology* 117:1710-1712
99. **Pandol SJ, Seifert H, Thomas MW, Rivier J, Vale W** 1984 Growth hormone-releasing factor stimulates pancreatic enzyme secretion. *Science* 225:326-328
100. **Green IC, Southern C, Ray K** 1990 Mechanism of action of growth-hormone-releasing hormone in stimulating insulin secretion in vitro from isolated rat islets and dispersed islet cells. *Horm Res* 33:199-204
101. **Konturek SJ, Bilski J, Jaworek J, Mochizuki T, Yanaihara C, Yanaihara N** 1989 Effects of growth hormone releasing factor on pancreatic secretion in vivo and in vitro. *Regul Pept* 24:301-311
102. **Hermansen K, Kappelgaard AM, Esmann J, Orskov H** 1986 Synthetic pancreatic growth hormone-releasing factor (GRF-40) stimulates the secretion of the endocrine pancreas. *Diabetes* 35:119-123
103. **Lehy T, Accary JP, Dubrasquet M, Lewin MJ** 1986 Growth hormone-releasing factor (somatocrinin) stimulates epithelial cell proliferation in the rat digestive tract. *Gastroenterology* 90:646-653

104. **Weigent DA, Riley JE, Galin FS, LeBoeuf RD, Blalock JE** 1991 Detection of growth hormone and growth hormone-releasing hormone-related messenger RNA in rat leukocytes by the polymerase chain reaction. *Proc Soc Exp Biol Med* 198:643-648
105. **Stephanou A, Knight RA, Lightman SL** 1991 Production of a growth hormone-releasing hormone-like peptide and its mRNA by human lymphocytes. *Neuroendocrinology* 53:628-633
106. **Brezis M, Rosen S** 1995 Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *N Engl J Med* 332:647-655
107. **Mayo KE** 1992 Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 6:1734-1744
108. **Lin C, Lin SC, Chang CP, Rosenfeld MG** 1992 Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360:765-768
109. **Gaylinn BD, Harrison JK, Zysk JR, Lyons CE, Lynch KR, Thorner MO** 1993 Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 7:77-84
110. **Hsiung HM, Smith DP, Zhang XY, Bennett T, Rosteck PR, Jr., Lai MH** 1993 Structure and functional expression of a complementary DNA for porcine growth hormone-releasing hormone receptor. *Neuropeptides* 25:1-10

111. **Horikawa R, Gaylinn BD, Lyons CE, Jr., Thorner MO** 2001 Molecular cloning of ovine and bovine growth hormone-releasing hormone receptors: the ovine receptor is C-terminally truncated. *Endocrinology* 142:2660-2668
112. **Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S** 1992 Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* 8:811-819
113. **Ishihara T, Nakamura S, Kaziro Y, Takahashi T, Takahashi K, Nagata S** 1991 Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. *EMBO J* 10:1635-1641
114. **Jelinek LJ, Lok S, Rosenberg GB, Smith RA, Grant FJ, Biggs S, Bensch PA, Kuijper JL, Sheppard PO, Sprecher CA, .** 1993 Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science* 259:1614-1616
115. **Thorens B** 1992 Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco- incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8641-8645
116. **Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ, Bonner TI** 1993 Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin- vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 133:2861-2870

117. **Pisegna JR, Wank SA** 1993 Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6345-6349
118. **Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC** 1992 Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* 11:1-20
119. **Girard N, Boulanger L, Denis S, Gaudreau P** 1999 Differential in vivo regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor by GHRH in young and aged rats. *Endocrinology* 140:2836-2842
120. **Miller TL, Godfrey PA, Dealmeida VI, Mayo KE** 1999 The rat growth hormone-releasing hormone receptor gene: structure, regulation, and generation of receptor isoforms with different signaling properties. *Endocrinology* 140:4152-4165
121. **Zeitler P, Stevens P, Siriwardana G** 1998 Functional GHRH receptor carboxyl terminal isoforms in normal and dwarf (dw) rats. *J Mol Endocrinol* 21:363-371
122. **Tang J, Lagace G, Castagne J, Collu R** 1995 Identification of human growth hormone-releasing hormone receptor splicing variants. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2381-2387
123. **Hashimoto K, Koga M, Motomura T, Kasayama S, Kouhara H, Ohnishi T, Arita N, Hayakawa T, Sato B, Kishimoto T** 1995 Identification of alternatively spliced messenger ribonucleic acid encoding truncated growth

hormone-releasing hormone receptor in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2933-2939

124. **Motomura T, Hashimoto K, Koga M, Arita N, Hayakawa T, Kishimoto T, Kasayama S** 1998 Inhibition of signal transduction by a splice variant of the growth hormone-releasing hormone receptor expressed in human pituitary adenomas. *Metabolism* 47:804-808
125. **Rekasi Z, Czompoly T, Schally AV, Halmos G** 2000 Isolation and sequencing of cDNAs for splice variants of growth hormone-releasing hormone receptors from human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10561-10566
126. **Rekasi Z, Varga JL, Schally AV, Plonowski A, Halmos G, Csernus B, Armatis P, Groot K** 2001 Antiproliferative actions of growth hormone-releasing hormone antagonists on MiaPaCa-2 human pancreatic cancer cells involve cAMP independent pathways. *Peptides* 22:879-886
127. **Kiaris H, Schally AV, Busto R, Halmos G, Artavanis-Tsakonas S, Varga JL** 2002 Expression of a splice variant of the receptor for GHRH in 3T3 fibroblasts activates cell proliferation responses to GHRH analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:196-200
128. **Adams EF, Symowski H, Buchfelder M, Poyner DR** 2000 A polymorphism in the growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) receptor gene is associated with elevated response to GHRH by human

pituitary somatotrophinomas in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 275:33-36

129. **Holtmann MH, Roettger BF, Pinon DI, Miller LJ** 1996 Role of receptor phosphorylation in desensitization and internalization of the secretin receptor. *J Biol Chem* 271:23566-23571
130. **Findlay DM, Houssami S, Lin HY, Myers DE, Brady CL, Darcy PK, Ikeda K, Martin TJ, Sexton PM** 1994 Truncation of the porcine calcitonin receptor cytoplasmic tail inhibits internalization and signal transduction but increases receptor affinity. *Mol Endocrinol* 8:1691-1700
131. **Hassan HA** 2001 Biological activities of two porcine growth hormone-releasing hormone receptor isoforms. *Arch Biochem Biophys* 387:20-26
132. **Gaylinn BD, Kap-Herr C, Golden WL, Thorner MO** 1994 Assignment of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene (GHRHR) to 7p14 by in situ hybridization. *Genomics* 19:193-195
133. **Wajnrajch MP, Chua SC, Green ED, Leibel RL** 1994 Human growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) maps to a YAC at chromosome 7p15. *Mamm Genome* 5:595
134. **Petersenn S, Rasch AC, Heyens M, Schulte HM** 1998 Structure and regulation of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. *Mol Endocrinol* 12:233-247
135. **Maheshwari HG, Baumann G** 1997 Genomic organisation and structure of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. *Proceedings*

of the 79th annual meeting of the Endocrine Society Minneapolis MN:p.P1-86

136. **Iguchi G, Okimura Y, Takahashi T, Mizuno I, Fumoto M, Takahashi Y, Kaji H, Abe H, Chihara K** 1999 Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. *J Biol Chem* 274:12108-12114
137. **Nogami H, Hiraoka Y, Matsubara M, Nonobe E, Harigaya T, Katayama M, Hemmi N, Kobayashi S, Mogi K, Aiso S, Kawamura K, Hisano S** 2002 A composite hormone response element regulates transcription of the rat GHRH receptor gene. *Endocrinology* 143:1318-1326
138. **Lin SC, Lin CR, Gukovsky I, Lusic AJ, Sawchenko PE, Rosenfeld MG** 1993 Molecular basis of the little mouse phenotype and implications for cell type-specific growth. *Nature* 364:208-213
139. **Morel G, Gallego R, Boulanger L, Pintos E, Garcia-Caballero T, Gaudreau P** 1999 Restricted presence of the growth hormone-releasing hormone receptor to somatotropes in rat and human pituitaries. *Neuroendocrinology* 70:128-136
140. **Takahashi T, Okimura Y, Yoshimura K, Shigeyoshi Y, Kaji H, Abe H, Chihara K** 1995 Regional distribution of growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor mRNA in the rat brain. *Endocrinology* 136:4721-4724

141. **Kato M, Hoyland J, Sikdar SK, Mason WT** 1992 Imaging of intracellular calcium in rat anterior pituitary cells in response to growth hormone releasing factor. *J Physiol* 447:171-189
142. **Lussier BT, French MB, Moor BC, Kraicer J** 1991 Free intracellular Ca^{2+} concentration and growth hormone (GH) release from purified rat somatotrophs. III. Mechanism of action of GH-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 128:592-603
143. **Lussier BT, French MB, Moore BC, Kraicer J** 1991 Free intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and growth hormone release from purified rat somatotrophs. I. GH-releasing factor-induced Ca^{2+} influx raises $[\text{Ca}^{2+}]_i$. *Endocrinology* 128:570-582
144. **Cuttler L, Glaum SR, Collins BA, Miller RJ** 1992 Calcium signalling in single growth hormone-releasing factor-responsive pituitary cells. *Endocrinology* 130:945-953
145. **Bilezikjian LM, Erlichman J, Fleischer N, Vale WW** 1987 Differential activation of type I and type II 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinases by growth hormone-releasing factor. *Mol Endocrinol* 1:137-146
146. **Brindle PK, Montminy MR** 1992 The CREB family of transcription activators. *Curr Opin Genet Dev* 2:199-204

147. **Frohman LA** 1996 Cellular physiology of growth hormone-releasing hormone. In: Springer-Verlag (ed). Growth hormone secretagogues. New York:137-146
148. **Holl RW, Thorner MO, Leong DA** 1988 Intracellular calcium concentration and growth hormone secretion in individual somatotropes: effects of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 122:2927-2932
149. **Cronin MJ, Summers ST, Sortino MA, Hewlett EL** 1986 Protein kinase C enhances growth hormone releasing factor (1-40)- stimulated cyclic AMP levels in anterior pituitary. Actions of somatostatin and pertussis toxin. *J Biol Chem* 261:13932-13935
150. **Cronin MJ, Canonico PL** 1985 Tumor promoters enhance basal and growth hormone releasing factor stimulated cyclic AMP levels in anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 129:404-410
151. **Ray KP, Wallis M** 1988 Regulation of growth hormone secretion and cyclic AMP metabolism in ovine pituitary cells: interactions involved in activation induced by growth hormone-releasing hormone and phorbol esters. *Mol Cell Endocrinol* 58:243-252
152. **Judd AM, Koike K, Yasumoto T, MacLeod RM** 1986 Protein kinase C activators and calcium-mobilizing agents synergistically increase GH, LH, and TSH secretion from anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 42:197-202

153. **Ohmura E, Friesen HG** 1985 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate stimulates rat growth hormone (GH) release through different pathways from that of human pancreatic GH-releasing factor. *Endocrinology* 116:728-733
154. **Trimble ER, Bruzzone R, Biden TJ, Meehan CJ, Andreu D, Merrifield RB** 1987 Secretin stimulates cyclic AMP and inositol trisphosphate production in rat pancreatic acinar tissue by two fully independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3146-3150
155. **Delporte C, Poloczek P, de Neef P, Vertongen P, Ciccarelli E, Svoboda M, Herchuelz A, Winand J, Robberecht P** 1995 Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide stimulate two signaling pathways in CHO cells stably transfected with the selective type I PACAP receptor. *Mol Cell Endocrinol* 107:71-76
156. **French MB, Moor BC, Lussier BT, Kraicer J** 1989 Protein kinase C is not essential for growth hormone (GH)-releasing factor-induced GH release from rat somatotrophs. *Endocrinology* 124:2235-2244
157. **Cobb MH** 1999 MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 71:479-500
158. **Pombo CM, Zalvide J, Gaylinn BD, Dieguez C** 2000 Growth hormone-releasing hormone stimulates mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 141:2113-2119
159. **Zeitler P, Siriwardana G** 2000 Stimulation of mitogen-activated protein kinase pathway in rat somatotrophs by growth hormone-releasing hormone. *Endocrine* 12:257-264

160. **Lee EJ, Duan WR, Kotlar T, Jameson JL** 2001 Restoration of growth hormone-releasing hormone (GHRH) responsiveness in pituitary GH3 cells by adenovirus-directed expression of the human GHRH receptor. *Endocrinology* 142:414-420
161. **Abribat T, Boulanger L, Gaudreau P** 1990 Characterization of [125I-Tyr¹⁰]human growth hormone-releasing factor (1-44) amide binding to rat pituitary: evidence for high and low affinity classes of sites. *Brain Res* 528:291-299
162. **Zysk JR, Cronin MJ, Anderson JM, Thorner MO** 1986 Cross-linking of a growth hormone releasing factor-binding protein in anterior pituitary cells. *J Biol Chem* 261:16781-16784
163. **Guarcello V, Weigent DA, Blalock JE** 1991 Growth hormone releasing hormone receptors on thymocytes and splenocytes from rats. *Cell Immunol* 136:291-302
164. **Boulanger L, Andersen PH, Gaudreau P** 1999 Development of a site-directed polyclonal antibody against the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its use to estimate GHRH receptor concentration in normal and hypothyroid rats. *Neuroendocrinology* 70:117-127
165. **Velicelebi G, Patthi S, Provow S, Akong M** 1986 Covalent cross-linking of growth hormone-releasing factor to pituitary receptors. *Endocrinology* 118:1278-1283

166. **Zysk JR, Gaylinn BD, Lyons CE, Johnson B, Eppler CM, Baumbach WR, Thorner MO** 1996 Purification of the growth hormone releasing hormone receptor with a C- terminal, biotinylated affinity ligand. *Biochem Biophys Res Commun* 221:133-139
167. **Dealmeida VI, Mayo KE** 1998 Identification of binding domains of the growth hormone-releasing hormone receptor by analysis of mutant and chimeric receptor proteins. *Mol Endocrinol* 12:750-765
168. **Horikawa R, Hellmann P, Cella SG, Torsello A, Day RN, Muller EE, Thorner MO** 1996 Growth hormone-releasing factor (GRF) regulates expression of its own receptor. *Endocrinology* 137:2642-2645
169. **Cella SG, Locatelli V, Mennini T, Zanini A, Bendotti C, Forloni GL, Fumagalli G, Arce VM, de GC, V, Wehrenberg WB, .** 1990 Deprivation of growth hormone-releasing hormone early in the rat's neonatal life permanently affects somatotropic function. *Endocrinology* 127:1625-1634
170. **Miki N, Ono M, Murata Y, Ohsaki E, Tamitsu K, Yamada M, Demura H** 1996 Regulation of pituitary growth hormone-releasing factor (GRF) receptor gene expression by GRF. *Biochem Biophys Res Commun* 224:586-590
171. **Bilezikjian LM, Seifert H, Vale W** 1986 Desensitization to growth hormone-releasing factor (GRF) is associated with down-regulation of GRF-binding sites. *Endocrinology* 118:2045-2052

172. **Aleppo G, Moskal SF, De Grandis PA, Kineman RD, Frohman LA** 1997 Homologous down-regulation of growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 138:1058-1065
173. **Maheshwari HG, Shen A, Baumann G** 1998 Structural and functional characterization of the promoter of the human growth hormone releasing hormone receptor gene. Proceedings of the 80th annual meeting of the Endocrine Society New Orleans:p. P2-210
174. **Lasko CM, Korytko AI, Wehrenberg WB, Cuttler L** 2001 Differential GH-releasing hormone regulation of GHRH receptor mRNA expression in the rat pituitary. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E626-E631
175. **Hansen BS, Gerlach LO, Hansen A, Foged C, Andersen PH** 2001 The growth hormone-releasing hormone receptor: desensitisation following short-term agonist exposure. *Pharmacol Toxicol* 88:81-88
176. **Seifert H, Perrin M, Rivier J, Vale W** 1985 Growth hormone-releasing factor binding sites in rat anterior pituitary membrane homogenates: modulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 117:424-426
177. **Lam KS, Lee MF, Tam SP, Srivastava G** 1996 Gene expression of the receptor for growth-hormone-releasing hormone is physiologically regulated by glucocorticoids and estrogen. *Neuroendocrinology* 63:475-480
178. **Korytko AI, Cuttler L** 1997 Thyroid hormone and glucocorticoid regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression. *J Endocrinol* 152:R13-R17

179. **Miller TL, Mayo KE** 1997 Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 138:2458-2465
180. **Tamaki M, Sato M, Matsubara S, Wada Y, Takahara J** 1996 Dexamethasone increases growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) receptor mRNA levels in cultured rat anterior pituitary cells. *J Neuroendocrinol* 8:475-480
181. **Tam SP, Lam KS, Srivastava G** 1996 Gene expression of hypothalamic somatostatin, growth hormone releasing factor, and their pituitary receptors in hypothyroidism. *Endocrinology* 137:418-424
182. **Miki N, Ono M, Murata Y, Ohsaki E, Tamitsu K, Ri T, Demura H, Yamada M** 1995 Thyroid hormone regulation of gene expression of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 217:1087-1093
183. **Vale W, Vaughan J, Yamamoto G, Spiess J, Rivier J** 1983 Effects of synthetic human pancreatic (tumor) GH releasing factor and somatostatin, triiodothyronine and dexamethasone on GH secretion in vitro. *Endocrinology* 112:1553-1555
184. **Nogami H, Matsubara M, Harigaya T, Katayama M, Kawamura K** 2000 Retinoic acids and thyroid hormone act synergistically with dexamethasone to increase growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 141:4396-4401

185. **Leid M, Kastner P, Lyons R, Nakshatri H, Saunders M, Zacharewski T, Chen JY, Staub A, Garnier JM, Mader S, .** 1992 Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68:377-395
186. **Ono M, Miki N, Murata Y, Osaki E, Tamitsu K, Ri T, Yamada M, Demura H** 1995 Sexually dimorphic expression of pituitary growth hormone-releasing factor receptor in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 216:1060-1066
187. **Gaudreau P, Veyrat-Durebex C, Denis S, Alliot J** 1998 Effect of aging on pituitary growth hormone-releasing factor receptor mRNA levels in male and female Wistar-Lou rats. Program of the 28th Annual Meeting of the Society for Neuroscience Los Angeles CA:442-17
188. **Kamegai J, Wakabayashi I, Kineman RD, Frohman LA** 1999 Growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R) and growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) mRNA levels during postnatal development in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 11:299-306
189. **Korytko AI, Zeitler P, Cuttler L** 1996 Developmental regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression in the rat. *Endocrinology* 137:1326-1331
190. **Deslauriers N, Gaudreau P, Abribat T, Renier G, Petitclerc D, Brazeau P** 1991 Dynamics of growth hormone responsiveness to growth hormone releasing factor in aging rats: peripheral and central influences. *Neuroendocrinology* 53:439-446

191. **Walker RF, Yang SW, Bercu BB** 1991 Robust growth hormone (GH) secretion in aged female rats co-administered GH-releasing hexapeptide (GHRP-6) and GH-releasing hormone (GHRH). *Life Sci* 49:1499-1504
192. **Parenti M, Dall'ara A, Rusconi L, Cocchi D, Muller EE** 1987 Different regulation of growth hormone-releasing factor-sensitive adenylate cyclase in the anterior pituitary of young and aged rats. *Endocrinology* 121:1649-1653
193. **Qing Y, Parenti M, Guzzi F, Ceresoli G, Muller EE, Cocchi D** 1994 Alterations of adenylyl cyclase-coupled growth hormone-releasing hormone (GHRH) pituitary receptors in different conditions of GHRH deprivation. *Brain Res* 644:13-18
194. **Abribat T, Deslauriers N, Brazeau P, Gaudreau P** 1991 Alterations of pituitary growth hormone-releasing factor binding sites in aging rats. *Endocrinology* 128:633-635
195. **Lefrancois L, Boulanger L, Gaudreau P** 1995 Effects of aging on pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites: in vitro mimicry by guanyl nucleotides and reducing agents. *Brain Res* 673:39-46
196. **Spik K, Sonntag WE** 1989 Increased pituitary response to somatostatin in aging male rats: relationship to somatostatin receptor number and affinity. *Neuroendocrinology* 50:489-494
197. **Gaudreau P, Robinette K, Girard N** 1999 Récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance et axe somatotrope: effet

du vieillissement et de la restriction calorique de longue durée chez le rat. L'année gérontologique. Paris:53-62

198. **Gaylinn BD, Dealmeida VI, Lyons CE, Jr., Wu KC, Mayo KE, Thorner MO** 1999 The mutant growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor of the little mouse does not bind GHRH. *Endocrinology* 140:5066-5074
199. **Baumann G, Maheshwari H** 1997 The Dwarfs of Sindh: severe growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. *Acta Paediatr Suppl* 423:33-38
200. **Hayashida CY, Gondo RG, Ferrari C, Tol do SP, Salvatori R, Levine MA, Ezabella MC, Abelin N, Gianella-Neto D, Wajchenberg BL** 2000 Familial growth hormone deficiency with mutated GHRH receptor gene: clinical and hormonal findings in homozygous and heterozygous individuals from Itabaianinha. *Eur J Endocrinol* 142:557-563
201. **Netchine I, Talon P, Dastot F, Vitaux F, Goossens M, Amselem S** 1998 Extensive phenotypic analysis of a family with growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 83:432-436
202. **Jorgensen F, Bentzon MW** 1968 The ultrastructure of the normal human glomerulus. Thickness of glomerular basement membrane. *Lab Invest* 18:42-48
203. **Ernst SA, Schreiber JH** 1981 Ultrastructural localization of Na⁺,K⁺-ATPase in rat and rabbit kidney medulla. *J Cell Biol* 91:803-813

204. **Kashgarian M, Biemesderfer D, Caplan M, Forbush B, III** 1985 Monoclonal antibody to Na,K-ATPase: immunocytochemical localization along nephron segments. *Kidney Int* 28:899-913
205. **Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Knepper MA, Agre P** 1993 CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol* 120:371-383
206. **Sabolic I, Valenti G, Verbavatz JM, Van Hoek AN, Verkman AS, Ausiello DA, Brown D** 1992 Localization of the CHIP28 water channel in rat kidney. *Am J Physiol* 263:C1225-C1233
207. **Brown D, Hirsch S, Gluck S** 1988 Localization of a proton-pumping ATPase in rat kidney. *J Clin Invest* 82:2114-2126
208. **Knepper MA, Packer R, Good DW** 1989 Ammonium transport in the kidney. *Physiol Rev* 69:179-249
209. **Marieb EN** 1999 Le système urinaire. *Anatomie et physiologie humaines*. Québec:872-927
210. **Imai M, Taniguchi J, Tabei K** 1987 Function of thin loops of Henle. *Kidney Int* 31:565-579
211. **Chou CL, Knepper MA, Hoek AN, Brown D, Yang B, Ma T, Verkman AS** 1999 Reduced water permeability and altered ultrastructure in thin descending limb of Henle in aquaporin-1 null mice. *J Clin Invest* 103:491-496

212. **Chou CL, Knepper MA** 1993 In vitro perfusion of chinchilla thin limb segments: urea and NaCl permeabilities. *Am J Physiol* 264:F337-F343
213. **Uchida S, Sasaki S, Nitta K, Uchida K, Horita S, Nihei H, Marumo F** 1995 Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, CIC-K1. *J Clin Invest* 95:104-113
214. **Knepper MA, Kim GH, Fernandez-Llama P, Ecelbarger CA** 1999 Regulation of thick ascending limb transport by vasopressin. *J Am Soc Nephrol* 10:628-634
215. **Baylis PH** 1987 Osmoregulation and control of vasopressin secretion in healthy humans. *Am J Physiol* 253:R671-R678
216. **Kim GH, Ecelbarger CA, Mitchell C, Packer RK, Wade JB, Knepper MA** 1999 Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* 276:F96-F103
217. **El Mernissi G, Doucet A** 1984 Specific activity of Na-K-ATPase after adrenalectomy and hormone replacement along the rabbit nephron. *Pflugers Arch* 402:258-263
218. **Horster M, Schmid H, Schmidt U** 1980 Aldosterone in vitro restores nephron Na-K-ATPase of distal segments from adrenalectomized rabbits. *Pflugers Arch* 384:203-206
219. **Greger R** 1985 Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev* 65:760-797

220. **Yoshikawa M, Uchida S, Yamauchi A, Miyai A, Tanaka Y, Sasaki S, Marumo F** 1999 Localization of rat CLC-K2 chloride channel mRNA in the kidney. *Am J Physiol* 276:F552-F558
221. **Schlatter E, Greger R** 1985 cAMP increases the basolateral Cl⁻ conductance in the isolated perfused medullary thick ascending limb of Henle's loop of the mouse. *Pflugers Arch* 405:367-376
222. **Burg MB, Green N** 1973 Function of the thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* 224:659-668
223. **Rocha AS, Kokko JP** 1973 Sodium chloride and water transport in the medullary thick ascending limb of Henle. Evidence for active chloride transport. *J Clin Invest* 52:612-623
224. **Barajas L** 1970 The ultrastructure of the juxtaglomerular apparatus as disclosed by three-dimensional reconstructions from serial sections. The anatomical relationship between the tubular and vascular components. *J Ultrastruct Res* 33:116-147
225. **Barajas L** 1979 Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol* 237:F333-F343
226. **Granger P, Dahlheim H, Thurau K** 1972 Enzyme activities of the single juxtaglomerular apparatus in the rat kidney. *Kidney Int* 1:78-88
227. **Flamenbaum W, Hamburger RJ** 1974 Superficial and deep juxtaglomerular apparatus renin activity of the rat kidney. Effect of surgical preparation and NaCl intake. *J Clin Invest* 54:1373-1381

228. **Deschepper CF, Mellon SH, Cumin F, Baxter JD, Ganong WF** 1986 Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal, and pituitary of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7552-7556
229. **Ehlers MR, Riordan JF** 1989 Angiotensin-converting enzyme: new concepts concerning its biological role. *Biochemistry* 28:5311-5318
230. **Wang T, Giebisch G** 1996 Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. *Am J Physiol* 271:F143-F149
231. **Lorenz JN, Weihprecht H, Schnermann J, Skott O, Briggs JP** 1990 Characterization of the macula densa stimulus for renin secretion. *Am J Physiol* 259:F186-F193
232. **Greger R** 2000 Physiology of renal sodium transport. *Am J Med Sci* 319:51-62
233. **Kim GH, Masilamani S, Turner R, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA** 1998 The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14552-14557
234. **Velazquez H, Bartiss A, Bernstein P, Ellison DH** 1996 Adrenal steroids stimulate thiazide-sensitive NaCl transport by rat renal distal tubules. *Am J Physiol* 270:F211-F219
235. **Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger MA, Brenner BM, Hebert SC** 1993 Primary structure and functional

- expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2749-2753
236. **Hebert SC, Gamba G, Kaplan M** 1996 The electroneutral Na⁽⁺⁾-(K⁺)-Cl⁻ cotransport family. *Kidney Int* 49:1638-1641
237. **Takada T, Yamamoto A, Omori K, Tashiro Y** 1992 Quantitative immunogold localization of Na, K-ATPase along rat nephron. *Histochemistry* 98:183-197
238. **Vandewalle A, Cluzeaud F, Bens M, Kieferle S, Steinmeyer K, Jentsch TJ** 1997 Localization and induction by dehydration of Cl⁻-K⁺ chloride channels in the rat kidney. *Am J Physiol* 272:F678-F688
239. **Silver RB, Soleimani M** 1999 H⁺-K⁺-ATPases: regulation and role in pathophysiological states. *Am J Physiol* 276:F799-F811
240. **Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J** 1997 Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev* 77:51-74
241. **Inoue T, Nonoguchi H, Tomita K** 2001 Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. *Cardiovasc Res* 51:470-480
242. **Marples D, Frokiaer J, Nielsen S** 1999 Long-term regulation of aquaporins in the kidney. *Am J Physiol* 276:F331-F339

243. **Sands JM, Nonoguchi H, Knepper MA** 1987 Vasopressin effects on urea and H₂O transport in inner medullary collecting duct subsegments. *Am J Physiol* 253:F823-F832
244. **Chou CL, Sands JM, Nonoguchi H, Knepper MA** 1990 Concentration dependence of urea and thiourea transport in rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* 258:F486-F494
245. **Shayakul C, Steel A, Hediger MA** 1996 Molecular cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter of rat kidney collecting ducts. *J Clin Invest* 98:2580-2587
246. **Knepper MA, Rector FCJ** 1991 Urinary concentration and dilution. In: Brenner BM, Rector FCJ (eds). *The Kidney*. Philadelphia:532-571
247. **Field LJ, Veress AT, Steinhilper ME, Cochrane K, Sonnenberg H** 1991 Kidney function in ANF-transgenic mice: effect of blood volume expansion. *Am J Physiol* 260:R1-R5
248. **Verlander JW, Tran TM, Zhang L, Kaplan MR, Hebert SC** 1998 Estradiol enhances thiazide-sensitive NaCl cotransporter density in the apical plasma membrane of the distal convoluted tubule in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 101:1661-1669
249. **Chin E, Zhou J, Bondy CA** 1992 Renal growth hormone receptor gene expression: relationship to renal insulin-like growth factor system. *Endocrinology* 131:3061-3066

250. **Rogers SA, Karl IE, Hammerman MR** 1989 Growth hormone directly stimulates gluconeogenesis in canine renal proximal tubule. *Am J Physiol* 257:E751-E756
251. **Andersson G, Jennische E** 1988 IGF-I immunoreactivity is expressed by regenerating renal tubular cells after ischaemic injury in the rat. *Acta Physiol Scand* 132:453-457
252. **Andersson GL, Skottner A, Jennische E** 1988 Immunocytochemical and biochemical localization of insulin-like growth factor I in the kidney of rats before and after uninephrectomy. *Acta Endocrinol (Copenh)* 119:555-560
253. **Feld S, Hirschberg R** 1996 Growth hormone, the insulin-like growth factor system, and the kidney. *Endocr Rev* 17:423-480
254. **Bortz JD, Rotwein P, DeVol D, Bechtel PJ, Hansen VA, Hammerman MR** 1988 Focal expression of insulin-like growth factor I in rat kidney collecting duct. *J Cell Biol* 107:811-819
255. **Chin E, Zhou J, Bondy C** 1992 Anatomical relationships in the patterns of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-1, and IGF-I receptor gene expression in the rat kidney. *Endocrinology* 130:3237-3245
256. **Rogers SA, Miller SB, Hammerman MR** 1990 Growth hormone stimulates IGF I gene expression in isolated rat renal collecting duct. *Am J Physiol* 259:F474-F479

257. **Kobayashi S, Clemmons DR, Venkatachalam MA** 1991 Colocalization of insulin-like growth factor-binding protein with insulin-like growth factor I. *Am J Physiol* 261:F22-F28
258. **Andersson GL, Ericson LE, Jennische E** 1990 Ultrastructural localization of IGF-I in the rat kidney; an immunocytochemical study. *Histochemistry* 94:263-267
259. **Quigley R, Baum M** 1991 Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on rabbit proximal convoluted tubule transport. *J Clin Invest* 88:368-374
260. **Chin E, Bondy C** 1992 Insulin-like growth factor system gene expression in the human kidney. *J Clin Endocrinol Metab* 75:962-968
261. **Chin E, Michels K, Bondy CA** 1994 Partition of insulin-like growth factor (IGF)-binding sites between the IGF-I and IGF-II receptors and IGF-binding proteins in the human kidney. *J Clin Endocrinol Metab* 78:156-164
262. **Bell GI, Gerhard DS, Fong NM, Sanchez-Pescador R, Rall LB** 1985 Isolation of the human insulin-like growth factor genes: insulin-like growth factor II and insulin genes are contiguous. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6450-6454
263. **Hammerman MR, Miller SB** 1993 The growth hormone insulin-like growth factor axis in kidney revisited. *Am J Physiol* 265:F1-14
264. **Corvilain J, Abramow M** 1972 Growth and renal control of plasma phosphate. *J Clin Endocrinol Metab* 34:452-459

265. **Laron Z, Klinger B** 1994 IGF-I treatment of adult patients with Laron syndrome: preliminary results. *Clin Endocrinol (Oxf)* 41:631-638
266. **Mulroney SE, Lumpkin MD, Haramati A** 1989 Antagonist to GH-releasing factor inhibits growth and renal Pi reabsorption in immature rats. *Am J Physiol* 257:F29-F34
267. **Hirschberg R, Ding H, Wanner C** 1995 Effects of insulin-like growth factor I on phosphate transport in cultured proximal tubule cells. *J Lab Clin Med* 126:428-434
268. **Hirschberg R** 1996 Insulin-like growth factor I in the kidney. *Miner Electrolyte Metab* 22:128-132
269. **Guler HP, Schmid C, Zapf J, Froesch ER** 1989 Effects of recombinant insulin-like growth factor I on insulin secretion and renal function in normal human subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2868-2872
270. **Dullaart RP, Meijer S, Marbach P, Sluiter WJ** 1992 Effect of a somatostatin analogue, octreotide, on renal haemodynamics and albuminuria in acromegalic patients. *Eur J Clin Invest* 22:494-502
271. **Marshall SM, Flyvbjerg A, Jorgensen KD, Weeke J, Orskov H** 1993 Effects of growth hormone and thyroxine on kidney insulin-like growth factor-I and renal growth in hypophysectomized rats. *J Endocrinol* 136:399-406
272. **Hirschberg R** 1993 Effects of growth hormone and IGF-I on glomerular ultrafiltration in growth hormone-deficient rats. *Regul Pept* 48:241-250

273. **Wolf E, Kahnt E, Ehrlein J, Hermanns W, Brem G, Wanke R** 1993 Effects of long-term elevated serum levels of growth hormone on life expectancy of mice: lessons from transgenic animal models. *Mech Ageing Dev* 68:71-87
274. **Doi T, Striker LJ, Gibson CC, Agodoa LY, Brinster RL, Striker GE** 1990 Glomerular lesions in mice transgenic for growth hormone and insulinlike growth factor-I. I. Relationship between increased glomerular size and mesangial sclerosis. *Am J Pathol* 137:541-552
275. **Fagin JA, Melmed S** 1987 Relative increase in insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid levels in compensatory renal hypertrophy. *Endocrinology* 120:718-724
276. **Mulroney SE, Lumpkin MD, Roberts CT, Jr., LeRoith D, Haramati A** 1992 Effect of a growth hormone-releasing factor antagonist on compensatory renal growth, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF-I receptor gene expression after unilateral nephrectomy in immature rats. *Endocrinology* 130:2697-2702
277. **Flyvbjerg A, Thorlacius-Ussing O, Naeraa R, Ingerslev J, Orskov H** 1988 Kidney tissue somatomedin C and initial renal growth in diabetic and uninephrectomized rats. *Diabetologia* 31:310-314
278. **Evan AP, Henry DP, Connors BA, Summerlin P, Lee WH** 1995 Analysis of insulin-like growth factors (IGF)-I, and -II, type II IGF receptor and IGF-binding protein-2 mRNA and peptide levels in normal and nephrectomized rat kidney. *Kidney Int* 48:1517-1529

279. **Lajara R, Rotwein P, Bortz JD, Hansen VA, Sadow JL, Betts CR, Rogers SA, Hammerman MR** 1989 Dual regulation of insulin-like growth factor I expression during renal hypertrophy. *Am J Physiol* 257:F252-F261
280. **Haramati A, Lumpkin MD, Mulroney SE** 1994 Early increase in pulsatile growth hormone release after unilateral nephrectomy in adult rats. *Am J Physiol* 266:F628-F632
281. **Fine L** 1986 The biology of renal hypertrophy. *Kidney Int* 29:619-634
282. **O'Shea MH, Layish DT** 1992 Growth hormone and the kidney: a case presentation and review of the literature. *J Am Soc Nephrol* 3:157-161
283. **Stiles AD, Sosenko IR, D'Ercole AJ, Smith BT** 1985 Relation of kidney tissue somatomedin-C/insulin-like growth factor I to postnephrectomy renal growth in the rat. *Endocrinology* 117:2397-2401
284. **Flyvbjerg A, Frystyk J, Thorlacius-Ussing O, Orskov H** 1989 Somatostatin analogue administration prevents increase in kidney somatomedin C and initial renal growth in diabetic and uninephrectomized rats. *Diabetologia* 32:261-265
285. **Menon RK, Stephan DA, Rao RH, Shen-Orr Z, Downs LS, Jr., Roberts CT, Jr., LeRoith D, Sperling MA** 1994 Tissue-specific regulation of the growth hormone receptor gene in streptozocin-induced diabetes in the rat. *J Endocrinol* 142:453-462

286. **Fervenza FC, Tsao T, Hoffman AR, Rabkin R** 1997 Regional changes in the intrarenal insulin-like growth factor-I axis in diabetes. *Kidney Int* 51:811-818
287. **Sayed-Ahmed N, Muchaneta-Kubara EC, Besbas N, Shortland J, Cope GH, el Nahas AM** 1993 Insulin-like growth factor-I and experimental diabetic kidney disease. *Exp Nephrol* 1:364-371
288. **Flyvbjerg A, Bornfeldt KE, Marshall SM, Arnqvist HJ, Orskov H** 1990 Kidney IGF-I mRNA in initial renal hypertrophy in experimental diabetes in rats. *Diabetologia* 33:334-338
289. **Segev Y, Landau D, Marbach M, Shehadeh N, Flyvbjerg A, Phillip M** 1997 Renal hypertrophy in hyperglycemic non-obese diabetic mice is associated with persistent renal accumulation of insulin-like growth factor I. *J Am Soc Nephrol* 8:436-444
290. **Bach LA** 1992 IGF-I and IGF binding proteins in diabetes-related kidney growth. *Growth Regul* 2:30-39
291. **Catanese VM, Sciavolino PJ, Lango MN** 1993 Discordant, organ-specific regulation of insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid in insulin-deficient diabetes in rats. *Endocrinology* 132:496-503
292. **Phillip M, Werner H, Palese T, Kowarski AA, Stannard B, Bach LA, LeRoith D, Roberts CT, Jr.** 1994 Differential accumulation of insulin-like growth factor-I in kidneys of pre- and postpubertal streptozotocin-diabetic rats. *J Mol Endocrinol* 12:215-224

293. **Werner H, Shen-Orr Z, Stannard B, Burguera B, Roberts CT, Jr., LeRoith D** 1990 Experimental diabetes increases insulinlike growth factor I and II receptor concentration and gene expression in kidney. *Diabetes* 39:1490-1497
294. **Marshall SM, Flyvbjerg A, Frystyk J, Korsgaard L, Orskov H** 1991 Renal insulin-like growth factor I and growth hormone receptor binding in experimental diabetes and after unilateral nephrectomy in the rat. *Diabetologia* 34:632-639
295. **Charlton HM, Clark RG, Robinson IC, Goff AE, Cox BS, Bugnon C, Bloch BA** 1988 Growth hormone-deficient dwarfism in the rat: a new mutation. *J Endocrinol* 119:51-58
296. **Flyvbjerg A, Frystyk J, Osterby R, Orskov H** 1992 Kidney IGF-I and renal hypertrophy in GH-deficient diabetic dwarf rats. *Am J Physiol* 262:E956-E962
297. **Gronbaek H, Volmers P, Bjorn SF, Osterby R, Orskov H, Flyvbjerg A** 1997 Effect of GH/IGF-I deficiency on long-term renal changes and urinary albumin excretion in diabetic dwarf rats. *Am J Physiol* 272:E918-E924
298. **Flyvbjerg A, Marshall SM, Frystyk J, Hansen KW, Harris AG, Orskov H** 1992 Octreotide administration in diabetic rats: effects on renal hypertrophy and urinary albumin excretion. *Kidney Int* 41:805-812

299. **Flyvbjerg A, Jorgensen KD, Marshall SM, Orskov H** 1991 Inhibitory effect of octreotide on growth hormone-induced IGF-I generation and organ growth in hypophysectomized rats. *Am J Physiol* 260:E568-E574
300. **Liu ZH, Striker LJ, Phillips C, Chen NY, Chen WY, Kopchick JJ, Striker GE** 1995 Growth hormone expression is required for the development of diabetic glomerulosclerosis in mice. *Kidney Int Suppl* 51:S37-S38
301. **Flyvbjerg A, Frystyk J, Marshall SM** 1990 Additive increase in kidney insulin-like growth factor I and initial renal enlargement in uninephrectomized-diabetic rats. *Horm Metab Res* 22:516-520
302. **Fujinaka Y, Yokogoshi Y, Zhang CY, Okura T, Kitagawa K, Saito S** 1996 Tissue-specific molecular heterogeneity of human growth hormone-releasing hormone receptor protein. *FEBS Lett* 394:1-4
303. **Boulanger L, Girard N, Strecko J, Gaudreau P** 2002 Characterization of a growth hormone-releasing hormone binding site in the rat renal medulla. *Peptides* 23:1187-1194
304. **Dubuisson S, Boisvert C, Gaudreau P** 2003 Cellules d'anse de Henlé mince en culture: une approche valide pour étudier le processus d'internalisation du récepteur du GHRH. Congrès annuel des stagiaires de recherche en santé de la Faculté de médecine, du CHUM et des Centres hospitaliers et Instituts affiliés à l'Université de Montréal Μοντρεαλ-Χαναδα

305. **Saermark T, Jacobsen C, Magee A, Vilhardt H** 1990 Internalization of growth hormone-releasing factor by rat anterior pituitary cells: inhibition by cerulenin, an inhibitor of fatty acid acylation. *J Mol Endocrinol* 4:51-59
306. **Veyrat-Durebex C, Pomerleau P, Gaudreau P** 2002 Internalization and trafficking of the human and rat growth hormone-releasing hormone receptor. *Molecular Pharmacology*(σουμιο)
307. **Fabre C, el Battari A, Karamanos Y, Couvineau A, Salomon R, Laburthe M, Marvaldi J, Pichon J, Luis J** 1993 Glycosylation of VIP receptors: a molecular basis for receptor heterogeneity. *Peptides* 14:483-489
308. **Kobayashi K, Uchida S, Mizutani S, Sasaki S, Marumo F** 2001 Developmental expression of CLC-K1 in the postnatal rat kidney. *Histochem Cell Biol* 116:49-56
309. **Rane S, Aperia A** 1985 Ontogeny of Na-K-ATPase activity in thick ascending limb and of concentrating capacity. *Am J Physiol* 249:F723-F728
310. **Yasui M, Marples D, Belusa R, Eklof AC, Celsi G, Nielsen S, Aperia A** 1996 Development of urinary concentrating capacity: role of aquaporin-2. *Am J Physiol* 271:F461-F468
311. **Uchida S, Marumo F** 2000 Severely impaired urine-concentrating ability in mice lacking the CLC- K1 chloride channel. *Exp Nephrol* 8:361-365
312. **Bonvalet JP** 1998 Regulation of sodium transport by steroid hormones. *Kidney Int Suppl* 65:S49-S56

313. **Morpurgo B, Dean CE, Porter TE** 1997 Identification of the blood-borne somatotroph-differentiating factor during chicken embryonic development. *Endocrinology* 138:4530-4535
314. **Leeper LL, Schroeder R, Henning SJ** 1988 Kinetics of circulating corticosterone in infant rats. *Pediatr Res* 24:595-599
315. **Henning SJ** 1978 Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am J Physiol* 235:E451-E456
316. **Alexandrova M, Macho L** 1976 Plasma corticosterone during postnatal ontogenesis in rats: comparison of protein-binding and fluorometric method. *Endokrinologie* 68:66-73
317. **Beck N, Yu BP** 1982 Effect of aging on urinary concentrating mechanism and vasopressin- dependent cAMP in rats. *Am J Physiol* 243:F121-F125
318. **Preisser L, Teillet L, Aliotti S, Gobin R, Berthonaud V, Chevalier J, Corman B, Verbavatz JM** 2000 Downregulation of aquaporin-2 and -3 in aging kidney is independent of V(2) vasopressin receptor. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F144-F152
319. **Geelen G, Corman B** 1992 Relationship between vasopressin and renal concentrating ability in aging rats. *Am J Physiol* 262:R826-R833
320. **Corman B, Di Stefano A, Wittner M, Geelen G** 1991 [Role of vasopressin in the modifications of renal function during aging]. *C R Seances Soc Biol Fil* 185:143-155

321. **Di Stefano A, Wittner M, Corman B** 1991 Vasopressin stimulation of NaCl transport in the medullary thick ascending limb of Henle's loop is decreased in aging mice. *Pflugers Arch* 419:327-331
322. **Klingler C, Preisser L, Barrault MB, Lluet P, Horgen L, Teillet L, Ancellin N, Corman B** 1997 Vasopressin V2 receptor mRNA expression and cAMP accumulation in aging rat kidney. *Am J Physiol* 272:R1775-R1782
323. **Kim J, Lee GS, Tisher CC, Madsen KM** 1996 Role of apoptosis in development of the ascending thin limb of the loop of Henle in rat kidney. *Am J Physiol* 271:F831-F845
324. **Paré C, Gaudreau P** 2001 Regulation of growth hormone-releasing hormone mRNA in the loop of Henle. *Peptide receptor 2001 International Symposium*--75
325. **Chen C, Xu R, Clarke IJ, Ruan M, Loneragan K, Roh SG** 2000 Diverse intracellular signalling systems used by growth hormone-releasing hormone in regulating voltage-gated Ca²⁺ or K channels in pituitary somatotropes. *Immunol Cell Biol* 78:356-368
326. **Terada Y, Yamada T, Takayama M, Nonoguchi H, Sasaki S, Tomita K, Marumo F** 1995 Presence and regulation of Raf-1-K (Kinase), MAPK-K, MAP-K, and S6-K in rat nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 6:1565-1577

327. **Takahashi N, Kondo Y, Ito O, Igarashi Y, Omata K, Abe K** 1995 Vasopressin stimulates Cl⁻ transport in ascending thin limb of Henle's loop in hamster. *J Clin Invest* 95:1623-1627
328. **Gambaryan S, Hausler C, Markert T, Pohler D, Jarchau T, Walter U, Haase W, Kurtz A, Lohmann SM** 1996 Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *J Clin Invest* 98:662-670
329. **Leidy JW, Jr., Cugini CD, Jr., Driscoll HK, Chertow BS** 1995 Time course of hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin content in streptozocin diabetic rats: evidence for early changes in hypothalamic regulation. *Brain Res* 681:84-90
330. **Busiguina S, Argente J, Garcia-Segura LM, Chowen JA** 2000 Anatomically specific changes in the expression of somatostatin, growth hormone-releasing hormone and growth hormone receptor mRNA in diabetic rats. *J Neuroendocrinol* 12:29-39
331. **Tannenbaum GS, Colle E, Gurd W, Wanamaker L** 1981 Dynamic time-course studies of the spontaneously diabetic BB Wistar rat. I. Longitudinal profiles of plasma growth hormone, insulin, and glucose. *Endocrinology* 109:1872-1879
332. **Gallego M, Chai Q, Marrero M, Ling B**, Stimulation of Na channels by IGF-1 in A6 cells. Possible role of tyrosine phosphorylation. p 337 (Abstract)

333. **Shimomura Y, Lee M, Oku J, Bray GA, Glick Z** 1982 Sodium potassium dependent ATPase in hypophysectomized rats: response to growth hormone, triiodothyronine, and cortisone. *Metabolism* 31:213-216
334. **Ludens JH, Bach RR, Williamson HE** 1969 Characteristics of the antinatriuretic action of growth hormone. *Proc Soc Exp Biol Med* 130:1156-1158
335. **Aperia AC** 1988 Dopamine inhibition of NaKATPase activity in proximal convoluted tubule cells. *Prog Clin Biol Res* 273:427-434
336. **Moe OW, Tejedor A, Levi M, Seldin DW, Preisig PA, Alpern RJ** 1991 Dietary NaCl modulates Na(+)-H⁺ antiporter activity in renal cortical apical membrane vesicles. *Am J Physiol* 260:F130-F137
337. **Barta P, Monti J, Maass PG, Gorzelniak K, Muller DN, Dechend R, Luft FC, Hubner N, Sharma AM** 2002 A gene expression analysis in rat kidney following high and low salt intake. *J Hypertens* 20:1115-1120
338. **Robertson GL** 1983 Thirst and vasopressin function in normal and disordered states of water balance. *J Lab Clin Med* 101:351-371
339. **Tribollet E, Arsenijevic Y, Barberis C** 1998 Vasopressin binding sites in the central nervous system: distribution and regulation. *Prog Brain Res* 119:45-55
340. **Kondo Y, Yoshitomi K, Imai M** 1988 Effect of Ca²⁺ on Cl⁻ transport in thin ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* 254:F232-F239

341. **Waldegger S, Jentsch TJ** 2000 Functional and structural analysis of ClC-K chloride channels involved in renal disease. *J Biol Chem* 275:24527-24533
342. **Uchida S, Rai T, Yatsushige H, Matsumura Y, Kawasaki M, Sasaki S, Marumo F** 1998 Isolation and characterization of kidney-specific ClC-K1 chloride channel gene promoter. *Am J Physiol* 274:F602-F610

