

2m11.3284.10

Université de Montréal

11618281

**Impact du diabète de type 1 sur le récepteur hypophysaire et rénal
du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat**

par
Julie Strecko

Programme de Sciences biomédicales
Faculté de Médecine



Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)
en Sciences biomédicales



Mai 2005

© Julie Strecko, 2005

w
4
U58
2005
v.102

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

Ce mémoire intitulé :

**Impact du diabète de type 1 sur le récepteur hypophysaire et rénal
du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat**

Présenté par:
Julie Strecko

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Omar Serri (président-rapporteur)
Dr Guylaine Ferland (membre du jury)
Dr Pierrette Gaudreau (directrice de recherche)



I. RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS FRANÇAIS

Dans les cellules somatotropes, la liaison du facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH) à son récepteur (GHRH-R) mène à la synthèse et la sécrétion de GH, ainsi qu'à la prolifération et la différenciation cellulaire. L'ARNm du GHRH-R a été détecté dans plusieurs tissus extrahypophysaires dont la médulla rénale qui contient les niveaux les plus élevés. Un GHRH-R fonctionnel est localisé spécifiquement dans les cellules de l'anse de Henlé (aH) ascendante mince. Chez le rat diabétique, de nombreuses perturbations de l'axe GH/IGF-I hypophysaire et rénal contribuent à la progression de la pathologie incluant la néphropathie diabétique. Pour mieux comprendre le mécanisme par lequel la réponse au GHRH est diminuée dans cet état d'hyperglycémie, le GHRH-R a été étudié.

L'objectif du présent projet de recherche a été de quantifier les niveaux d'ARNm du GHRH-R et de sa protéine dans des homogénats d'hypophyses antérieures et les cellules de aH mince semi-purifiées (aHm sp) chez des rats diabétiques de type 1, en fonction de la durée et de la sévérité du diabète. Un diabète de type 1 a été induit chez des rats mâles Sprague Dawley par injection à la streptozotocine (STZ). Un modèle de diabète de courte (2 et 21 jours post-STZ) et de longue durée (60 jours post-STZ) a été utilisé. Les niveaux d'ARNm du GHRH-R ont été analysés par buvardage Northern dans l'hypophyse et par protection à la RNase dans la médulla rénale et ceux du GHRH-R, par électrophorèse sur gel, suite à une réticulation chimique des complexes radioligand-récepteur. Un dosage par radioligand a été mis au point dans des cellules de l'aHm sp, dans le cadre de cette étude. Finalement, des études d'internalisation du GHRH-R ont été réalisées dans des cellules hypophysaires et des cellules BHK exprimant le hGHRH-R, en utilisant un agoniste fluorescent du GHRH.

Une régulation différentielle du GHRH-R et de son ARNm a été observée dans les deux tissus étudiés, en fonction de la durée et de la sévérité du diabète. Dans

l'hypophyse antérieure, une augmentation des niveaux de transcrit d'ARNm de 2.5 kb, encodant le récepteur fonctionnel, a été détectée 2 jours post-STZ. Vingt et un jours post-SZT, les niveaux de transcrits de 2.5 et 4 kb étaient élevés. Ceci était accompagné par une augmentation de l'abondance du complexe ^{125}I -GHRH-GHRH-R de 72 kDa. Soixante jours post-STZ, le niveau de transcrit de 4 kb demeure élevé et le complexe ligand-récepteur de 45 kDa était diminué. Ainsi, un diabète de longue durée pourrait réguler négativement le niveau de GHRH-R fonctionnel, possiblement suite à la liaison de son transcrit à une protéine adaptatrice, ayant pour effet de diminuer une traduction optimale ou, suite à la glycosylation du GHRH-R, qui diminuerait l'affinité de liaison du GHRH, sa capacité d'internalisation tel que démontré *in vitro* et/ou sa concentration à la membrane cytoplasmique. Dans les cellules d'aHm sp, une régulation négative rapide des niveaux d'ARNm du GHRH-R est observée, suivie d'une augmentation transitoire des niveaux des complexes ligand-récepteur de 68 kDa, 2 jours post-STZ et de 53 kDa, 21 jours post-STZ. Un état hyperglycémique, incluant la glucotoxicité cellulaire, pourraient donc exercer directement et/ou indirectement des effets délétères sur le GHRH-R, et conséquemment sur la sensibilité au GHRH de différentes populations cellulaires cibles.

Mots clés: Facteur de libération de l'hormone de croissance, GHRH-R, hypophyse antérieure, médulla rénale, anse de Henlé mince, diabète de type 1.

II. RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS ANGLAIS

In somatotroph cells, the binding of hypothalamic growth hormone-releasing hormone (GHRH) to its receptor (GHRH-R) leads to GH synthesis and secretion and cellular proliferation and differentiation. The presence of GHRH-R mRNA transcripts has been reported in several extrapituitary tissues and the renal medulla contains the highest level. A functional GHRH-R is localized in the thin ascending limb of Henle's loop (HL). In diabetic rats, perturbations of pituitary and renal GH/IGF-I systems contribute to progression of the disease including diabetic nephropathy. To better understand the mechanism by which the response to GHRH is decreased in this state of chronic hyperglycemia, the GHRH-R was studied.

The objective of this project was quantified GHRH-R mRNA and protein levels in anterior pituitary homogenates and semi-purified thin ascending limb of the HL (sp talHL) cells in type 1 diabetic rats. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of STZ in male Sprague Dawley rats. Rat models of short (2 and 21 days post-STZ) and long-term (60 days post-STZ) diabetes were used. GHRH-R mRNA levels were analyzed by Northern blotting in pituitary and by ribonuclease protection assay in renal medulla kidney. Receptor levels were assessed by gel electrophoresis after chemical cross-linking. A binding assay was developed in semi-purified thin limb of the HL (sp tlHL) cells. Finally, *in vitro* internalization studies were performed in anterior pituitary and hGHRH-R-transfected BHK cells, using a fluorescent agonist of GHRH.

A differential regulation of the GHRH-R and its mRNA was observed in the two tissues studied, as a function of the duration and severity of diabetes. In the anterior pituitary of diabetic rats, 2 days post-STZ administration, the 2.5-kb transcript coding for the functional receptor, was increased. Twenty-one days post-STZ, both the 2.5- and 4-kb transcripts were significantly increased. This was accompanied by an increase of the 72-kDa ¹²⁵I-GHRH-GHRH-R complex. Sixty days post-STZ, the 4-kb

transcript remained up-regulated and a decrease of the 45-kDa ligand-receptor complex was seen. Thus, a long-term diabetes could negatively regulate the level of functional GHRH-R, possibly due to the binding of the GHRH-R mRNA transcript to an adaptor protein, preventing optimal translation, or resulting from a glycosylation, which could result in a decrease of GHRH affinity, its ability to internalize, as demonstrated *in vitro*, and/or its concentration. In sp tHL cells, a rapid negative regulation of GHRH-R mRNA levels was observed, followed by an increase of the 68-kDa ligand-receptor complex, 2 days post-STZ, and an increase of the 53-kDa complex, 21 days post-STZ. Altogether, an hyperglycemic status, including cellular glucotoxicity, could directly and/or indirectly exert deleterious effects on GHRH-R and consequently on sensitivity of target cell populations to GHRH.

Key words: Growth hormone-releasing hormone, GHRH-R, anterior pituitary, renal medulla, thin Henle's loop, type 1 diabetes.

I. 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
V.	Liste des tableaux.....	xi
VI.	Liste des abréviations.....	xii
VII.	Liste des acides aminés.....	xv
VIII.	Remerciements.....	xvi
IX.	Dédidace.....	xviii
1.	INTRODUCTION.....	1
1.1	HORMONE DE CROISSANCE ET SON RECEPTEUR.....	2
1.1.1	Structure de l'hormone de croissance et de son récepteur.....	2
1.1.2	Localisation de la GH et du GH-R.....	3
1.1.3	Mécanisme d'action de la GH et du GH-R.....	3
1.1.4	Régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance.....	4
1.1.4.1	Le facteur de libération de la GH et de la somatostatine...	5
1.1.4.2	L'IGF-I et la ghreline.....	5
1.1.4.3	Hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes.....	6
1.1.4.4	Facteurs physiologiques.....	7
1.1.4.5	Mutations.....	7
1.1.5	Rôle de l'hormone de croissance.....	8
1.2	FACTEUR DE LIBERATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE.....	9
1.2.1	Isolation et structure du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	9
1.2.2	Structure du gène et précurseur du GHRH.	9
1.2.3	Localisation du GHRH.....	11

1.2.4	Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du GHRH....	12
1.2.5	Régulation de l'expression du GHRH.....	13
1.2.5.1	GH, IGF-I et ghreline.....	13
1.2.5.2	Hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes.....	14
1.2.5.3	Peptides, hormones hypothalamiques et neurotransmetteurs centraux.....	14
1.2.5.4	Facteurs physiologiques.....	14
1.2.6	Rôle du GHRH.....	15
1.2.6.1	Prolifération et différenciation.....	15
1.2.6.2	Contrôle de l'appétit et du sommeil.....	16
1.3	RECEPTEUR HYPOPHYSIAIRE DU FACTEUR DE LIBERATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE.....	17
1.3.1	Structure du récepteur hypophysaire du GHRH.....	17
1.3.2	Structure du gène du récepteur hypophysaire du GHRH.....	20
1.3.2.1	Sites d'initiation de la transcription.....	21
1.3.2.2	Sites de liaison pour les facteurs de transcription.....	22
1.3.2.3	Éléments de réponses aux hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes.....	23
1.3.3	Isoformes du récepteur hypophysaire du GHRH.....	24
1.3.4	Localisation tissulaire du récepteur du GHRH.....	27
1.3.5	Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du récepteur du GHRH.....	28
1.3.5.1	Tissu hypophysaire.....	28
1.3.5.2	Tissus extrahypophysaires.....	30
1.3.6	Régulation de l'expression du récepteur du GHRH.....	30
1.3.6.1	GHRH et IGF-I.....	30
1.3.6.2	Hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes.....	31
1.3.6.3	Facteurs physiologiques.....	32

1.3.7	Voies de signalisation du GHRH-R.....	33
1.3.7.1	Voie adénylate cyclase-AMPC-protéine kinase A.....	33
1.3.7.2	Voie phosphatidylinositol/protéine kinase C.....	35
1.3.7.3	Voie des « mitogen-activated protein kinase ».....	35
1.3.8	Rôle du GHRH-R.....	35
1.3.8.1	Rôle hypophysaire.....	35
1.3.8.2	Rôle extrahypophysaire.....	36
1.4	AXE SOMATOTROPE ET DIABETE.....	37
1.4.1	Définition du diabète de type 1 et 2.....	37
1.4.2	Fonction somatotrope dans le diabète de type 1.....	37
1.4.3	IGF-I et son récepteur.....	39
1.5	JUSTIFICATION DE L'ETUDE ET OBJECTIFS.....	41
2.	MANUSCRITS.....	44
2.1	Strecko J, Veyrat-Durebex C, Hoa S, Farrajota K, Boisvert C, Gaudreau P 2005 Regulation of pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocine-diabetic rats. Soumis à J Cell Physiology.....	45
3.	ANNEXE 1.....	88
3.1	Strecko J, Gaudreau P 2003 Développement d'une technique de radiolisation au GHRH dans les cellules d'anse de Henlé mince.	
4.	DISCUSSION.....	104
4.1	Diabète.....	105
4.2	Validité du modèle de diabète de type 1.....	106

4.3	Quantification des niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire et rénal au cours du diabète.....	108
4.4	Régulation du GHRH-R hypophysaire et rénal.....	110
4.5	Effet de la glucotoxicité sur le GHRH-R.....	112
4.6	Influence hormonale.....	113
4.7	Rôle du système GHRH-R dans le diabète.....	114
4.8	Lien possible entre le vieillissement et le diabète.....	115
5.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	117
6.	BIBLIOGRAPHIE.....	120
7.	ANNEXE 2.....	160
7.1	CONTRIBUTIONS ORIGINALES.....	161
7.2	COMMUNICATIONS PAR AFFICHE.....	161

IV. LISTE DES FIGURES

1. INTRODUCTION	1
Figure 1 : Régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance dans la cellule somatotrope.....	6
Figure 2 : Structure du GHRH-R hypophysaire de rat.....	19
Figure 3 : Voies de signalisation impliquées dans la somatotrope en réponse au GHRH.....	34
2. MANUSCRITS	44
Regulation of pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor in type-I diabetic rats.	
Figure 1 : Regulation of GHRH-R mRNA transcripts in the anterior pituitary of control (C) and diabetic (Dia) rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration.....	78
Figure 2 : Regulation of GHRH-R mRNA protected fragments in the renal medulla of control (C) and diabetic (Dia) rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration.....	80
Figure 3 : Regulation of anterior pituitary ¹²⁵ I-GHRH-GHRH-R levels of control (C) and diabetic (Dia) rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration.....	82
Figure 4 : Regulation of medullary thin Henle's loop cells ¹²⁵ I-GHRH-GHRH-R levels of control (C) and diabetic (Dia) rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration.....	84
Figure 5 : <i>In vitro</i> effects of D- and L-glucose on the internalization of Fluo-GHRH in hGHRH-R-transfected BHK and rat anterior pituitary.....	86

3. ANNEXE 1	88
Développement d'un essai de liaison au GHRH dans les cellules d'anse de Henlé mince.	
Figure 1 : A) Profil de la cinétique d'association du ¹²⁵ I-GHRH à 23°C, dans un homogénat de médulla rénale B) Effet de la concentration protéique sur la liaison spécifique du ¹²⁵ I-GHRH à 23°C, durant 60 min.....	99
Figure 2 : A) Profil de la cinétique d'association du ¹²⁵ I-GHRH à 23°C, dans un homogénat de cellules d'aHm sp. B) Effet de la concentration protéique sur la liaison spécifique du ¹²⁵ I-GHRH à 23°C, durant 60 min.....	100
4. DISCUSSION	104
Figure 1 : Représentation photographique A) Rat témoin (gauche) et diabétique (droite) 21 jours post-STZ, B) Rat témoin (gauche) et rat diabétique (droite) 60 jours post-STZ....	107

V. LISTE DES TABLEAUX

2. MANUSCRITS	44
Regulation of pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor in type-I diabetic rats.	
Tableau 1 : Body weight, kidney wet weight, food and water intakes and biochemical parameters of short- (2 and 21 days) and long-term (60 days) STZ-diabetic rats used for the GHRH-R mRNA study.....	76
Tableau 2 : Body weight, kidney wet weight, food and water intakes and biochemical parameters of short- (2 and 21 days) and long-term (60 days) STZ diabetic-rats used for the ¹²⁵ I-GHRH cross-linking study.....	77
3. ANNEXE 1	88
Développement d'un essai de liaison au GHRH dans les cellules d'anse de Henlé mince.	
Tableau 1 : Optimisation du cocktail d'inhibiteurs de protéases du tampon d'essai de liaison du ¹²⁵ I-GHRH dans un homogénat de médulla.....	101
Tableau 2 : Optimisation du cocktail d'inhibiteurs de protéases du tampon d'essai de liaison du ¹²⁵ I-GHRH dans un homogénat de cellules d'aHm sp.....	102

VI. LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	: acide aminé
AC	: adénylate cyclase
ADN	: acide désoxyribonucléique
aH	: anse de Henlé
aHm	: anse de Henlé mince
aHm sp	: anse de Henlé mince semi-purifié
AMPC	: adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
AP	: protéine activatrice
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: acide ribonucléique messenger
AT1	: récepteur de l'angiotensine II
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
cDNA	: ADN complémentaire
C/Eb $\pi\alpha$: CCAAT/ <i>Enhancer-binding protein alpha</i>
CHO	: lignée cellulaire d'ovaire 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
DMT	: domaines transmembranaires
dw	: nain
ERE	: récepteur aux estrogènes
Ets-1	: transcription factor E26 transformation-specific-1
FSH	: folliculostimuline
GAPDH	: glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase
GH	: hormone de croissance

GHF-1	: growth hormone factor-1
GH-R	: récepteur de l'hormone de croissance
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
h	: heure
Hela	: lignée cellulaire cancéreuse humaine
HEK	: lignée cellulaire embryonnaire rénale humaine
HEPES	: acide <i>N</i> -2-hydroxyéthylpipérazine- <i>N'</i> -2-éthane sulfonique
hGH	: hormone de croissance humaine
hGHRH	: facteur de libération de l'hormone de croissance humain
IGF-I	: facteur insulinique de croissance de type I
IP	: phosphatidylinositol
IRS-1	: <i>insuline receptor substrate-1</i>
j	: jours
JAK2	: janus kinase 2
kb	: kilobase
kDa	: kilodalton
LNCaP	: lignée cellulaire cancéreuses humaines prostatiques
LS	: liaison spécifique
MAPK	: <i>mitogen activated protein kinase</i>
MEK-1	: MAP/ERK Kinase I
MiaPaC-2	: lignée cellulaire cancéreuses humaines pancréatiques
MOPS	: acide 3-(<i>N</i> -morpholino)propanesulfonique
MR	: médulla de rein
Nf-1	: facteur nucléaire 1

NF- κ B	: facteur nucléaire- κ B
NPY	: neuropeptide Y
nt	: nucléotide
pb	: paire de base
PBS	: tampon phosphate
PACAP	: peptide hypophysaire stimulateur de l'adénylate cyclase
PHI	: peptide histidine isoleucine
PI3K	: phosphatidyl inositol-3 kinase
PIP2	: phosphatidylinositol-biphosphate
Pit-1	: facteur de transcription à domaine POU (spécifique à l'hypophyse)
PKA	: protéine kinase A
PKC	: protéine kinase C
PTH	: hormone parathyroïde
rGHRH	: facteur de libération de l'hormone de croissance de rat
RPA	: protection à la RNase
RT-PCR	: transcription inverse et amplification en chaîne par polymérase
SDS	: dodécyl sulfate de sodium
sp	: semi-purifiée
Sp-1	: protéine stimulante-1
SRIF	: somatostatine
STZ	: streptozotocine
SRIF	: somatostatine
STAT5	: <i>signal transducers and activators of transcription 5</i>
STZ	: streptozotocine
SV1	: <i>splice variant</i>
TRE	: élément de réponse
USF	: <i>upstream regulatory factor</i>
VIP	: <i>peptide intestinal vasoactif</i>

VII. LISTE DES ACIDES AMINÉS

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

VII. REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier le Dr Pierrette Gaudreau pour m'avoir accueillie dans son laboratoire de Neuroendocrinologie du vieillissement, en tant que stagiaire au baccalauréat, puis étudiante à la maîtrise. Son expertise et ses précieux conseils ont grandement contribué à ce mémoire et à l'article qu'il contient. Un merci sincère pour sa grande générosité et son soutien. Malgré ses nombreuses occupations, elle a su m'enrichir de ses connaissances et me guider dans le développement de mon cheminement académique et technique.

Merci, au Dr Omar Serri et Dr Guylaine Ferland, d'avoir accepté de corriger mon mémoire. Merci pour vos précieux commentaires et suggestions qui ont enrichi la version finale de mon mémoire.

Merci à chacun des membres du laboratoire NEV présents et passés pour leur aide précieuse tout au long de mon projet. Un merci plus particulier à Christelle Veyrat-Durbex, Karine Robinette, Sabrina Hoa et Sophie Dubuisson pour leurs précieux conseils, leur soutien moral, leur joie de vivre et les beaux moments passés ensemble. Merci Sophie, le 21 décembre 2004 restera gravé dans ma mémoire longtemps!

Merci à mes professeurs qui m'ont aidé dans mon cheminement académique. Merci aux membres du centre de recherche du CHUM pour leur aide au cours de ma maîtrise. Merci également à Isabelle et Alain qui ont partagé mes premières années de recherche.

Mes remerciements s'adressent également au réseau provincial du FRSQ en Géro-nto-Gériatrie, à l'Association Diabète Québec et au programme de Sciences Biomédicales pour les bourses qu'ils m'ont accordées.

Enfin, un merci du fond du coeur à ma famille, mon amour François et mes ami(e)s. Merci pour votre soutien, vos encouragements et votre grande compréhension. Merci Maman pour ton écoute, tes nombreux conseils, ton soutien moral,... Merci Papa, Ana et Frère d'avoir été là pour moi. Merci François pour ta compréhension, ta patience et ton amour. Et oui, j'ai enfin terminé!

*À ma famille et
à l'amour de ma vie
que j'aime tant !*



1. INTRODUCTION

1.1 L'HORMONE DE CROISSANCE ET SON RECEPTEUR

1.1.1 Structure de l'hormone de croissance et de son récepteur

L'hormone de croissance (GH) est une hormone anabolique des plus importante de l'organisme. Elle a été isolée pour la première fois à partir d'hypophyses bovines (Li et coll., 1945). Le gène humain (hGH) de ce polypeptide mesure moins de 2 kb et est situé sur le chromosome 17. Il est composé de cinq exons et de quatre introns. Il présente une très forte homologie avec le gène de la prolactine (Niall et coll., 1971). Les facteurs qui se lient au promoteur de la GH sur le gène sont NF-1 (facteur nucléaire 1) (Rosenfeld et Kelly, 1986; Courtois et coll., 1990), AP-2 (protéine activatrice-2) (Imagawa et coll., 1987; Bodner et Karin, 1987), l'USF (*upstream stimulatory factor*), SP-1 (protéine stimulante-1) et Pit-1 (facteur de transcription spécifique à l'hypophyse) (Lemaigre et coll., 1989).

La GH est une protéine non glycosylée composée d'une unique chaîne de 191 acides aminés (aa) et contient deux ponts disulfures. Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur ou préprohormone dont le clivage protéolytique donne naissance à l'hormone active. Chez l'humain, l'isoforme majeure de la GH possède une taille moléculaire apparente de 22 kDa (191 aa) (Baumann, 1991). La seconde isoforme la plus abondante est celle de 20 kDa (176 aa) (Lewis et coll., 1978). Elle résulte de la délétion des aa 32-46 de la protéine de 22 kDa (Lewis et coll., 1987; Cooke et coll., 1988) et compte pour 10-15% de la GH totale dans l'hypophyse humaine (Lewis et coll., 1987). La forme de 22 kDa est responsable de la majorité des activités biologiques de la GH. L'isoforme de 20 kDa stimule la croissance de façon similaire à celle de 22 kDa (Uchida et coll., 1997), mais exerce une activité antinatriurétique (Satozawa et coll., 2000), diabétogène et lipolytique réduite (Lewis et coll., 1991; Ishikawa et coll., 2001). L'affinité de liaison de la forme de 20 kDa à son récepteur (GH-R) est plus faible que celle de la forme de 22 kDa.

Le GH-R a été cloné en 1987 (Leung et coll., 1987). Il est composé de 620 aa et comprend une région N-terminale extracellulaire, une région trans-

membranaire renfermant quatre résidus Cys et une région C-terminale intracellulaire. Le GH-R appartient à la famille des récepteurs des cytokines et/ou hématopoïétiques, lesquels contiennent un domaine tyrosine-kinase dans leur région cytoplasmique (Cosman et coll., 1990; Kelly et coll., 1993).

1.1.2 Localisation de la GH et du GH-R

La GH est l'hormone la plus abondante de l'hypophyse antérieure. Elle est synthétisée, emmagasinée et sécrétée par les cellules somatotropes (Le CAM et Legraverend, 1993 ; Andreasen et coll., 1996). Elle est également produite localement dans plusieurs tissus extrahypophysaires tels que le cerveau, le placenta, la glande mammaire, le testicule (Harvey et Hull 1997), les cellules immunocompétentes (Auemhammer et Strasburger, 1995), le tissu adipeux (Gorin et coll., 1984) et y agit de manière autocrine ou paracrine. Son récepteur est exprimé dans plusieurs tissus tels que le foie (Kelly et coll., 1973 ; Mathews et coll., 1989 ; Carlsson et coll., 1990), le tissu adipeux (Carter-Su et coll., 1984), les leucocytes (Kelley et coll., 1992), la peau (Carlsson et coll., 1990), le muscle squelettique et le cœur (Mathews et coll., 1989 ; Carlsson et coll., 1990), le testicule, l'intestin et le pancréas (Mathews et coll., 1989), la surrénale (Teh et coll., 1988) et le rein (Mathews et coll., 1989), plus spécifiquement au niveau du tubule proximale et de l'anse de Henle (aH) épaisse (Chin et coll., 1992).

1.1.3 Mécanisme d'action de la GH

La GH peut agir directement au niveau du foie, des muscles et du tissu adipeux (Le Cam et Legraverend, 1993; Andreasen et coll., 1996 ; Carter-Su et coll., 1996). Elle stimule également la synthèse et la sécrétion du facteur insulinique de croissance de type-I (IGF-I) (Schwander et coll., 1983; Mathews et coll., 1986) qui exerce des effets selon un mode endocrinien, paracrine ou autocrine. Les effets de l'IGF-I sont glycogéniques (Freemark et coll., 1985), lipogéniques (Etherton et Evoke, 1986) et antilipolytiques (Pascual et coll., 1995). La GH a des effets sur la croissance des os longs *via* IGF-I (Isgaard et coll., 1986).

Les actions de la GH sur ses tissus cibles sont médiées par sa liaison au GH-R qui possède une activité tyrosine-kinase intrinsèque. La GH se lie d'abord au GH-R dans le domaine extracellulaire, ce qui résulte en la phosphorylation d'un résidu tyrosine et d'une dimérisation du GH-R (Leung et coll., 1987). Il s'ensuit une cascade de phosphorylation et l'activation d'une série de voie intracellulaire impliquant JAK2 (Janus kinase 2), un non-récepteur tyrosine kinase de la famille Janus (Argetsinger et coll., 1993). Les voies intracellulaires impliquées sont celles de STAT5 (*signal transducers and activators of transcription 5*), Ras/Raf/MEK1 (*mitogen activated protein extracellular signal-regulated kinase 1*) /MAPK (*mitogen activated protein kinase*) et IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*) /PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) (Carter-Su et coll., 1996; Liang et coll., 2000).

1.1.4 Régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance

La sécrétion de GH est soumise à un rythme circadien et est sécrétée de manière épisodique avec des pics nocturnes, liés aux différents stades du sommeil, et des pics diurnes dont certains sont liés aux apports nutritionnels, à l'exercice et au stress (Parker et coll., 1969; Winer et coll., 1990). La nature pulsatile de la sécrétion de GH est essentielle à son fonctionnement biologique optimal (Sonntag et coll., 1999). Chez les mammifères, les niveaux de GH sont élevés avant la naissance et diminuent par la suite (Gluckman et coll., 1981). Avec le vieillissement, la sécrétion de GH diminue chez les rongeurs (Sonntag et coll., 1980; Deslauriers et coll., 1991) et les humains (Rudman, 1985; Ho et coll., 1987; Lang et coll., 1987; Takahashi et coll., 1987).

Chez le rat, le profil de sécrétion de la GH est soumis à un dimorphisme sexuel. Chez le mâle, le niveau basal de GH est faible et les pics de sécrétion sont de forte amplitude et à une fréquence régulière (3.3 h). Chez la femelle, le niveau basal est plus élevé et les pics de sécrétion sont de plus faible amplitude que chez le mâle et irréguliers (Jansson et coll., 1985; Gabriel et coll., 1992). Les cellules somatotropes sécrètent 2 à 3 fois plus de GH chez le mâle adulte que chez la femelle (Ono et coll., 1995). Les différences observées durant la période

péri-pubertaire, et qui perdurent chez l'adulte, sont attribuées à l'influence de facteurs gonadiques (Jansson et coll., 1987; Kamegai J 1999).

1.1.4.1 Le facteur de libération de la GH et la somatostatine

Le facteur de libération de la GH (GHRH) et la somatostatine (SRIF) contrôlent la sécrétion épisodique de la GH (Andreasen et coll., 1996). Celle-ci serait précédée par une réduction du tonus somatostatinergique hypothalamique et initiée par la libération de GHRH dans le système porte (Plotsky et Vale, 1986). Le GHRH est principalement synthétisé dans le noyau arqué et la SRIF dans le noyau périventriculaire rostral (Crowley et Terry, 1980 ; Sawchenko et coll., 1985). Le GHRH stimule la synthèse et la sécrétion de la GH, ainsi que la prolifération des cellules somatotropes (Barinaga et coll., 1983 ; Billestrup et coll., 1986). La SRIF inhibe la synthèse et la sécrétion de la GH hypophysaire (Barinaga et coll., 1985 ; Sarret et coll., 1999). En plus de l'action opposée de ces peptides, la sécrétion de GH est modulée par un ensemble de rétrocontrôle qui s'exerce à plusieurs niveaux de l'axe somatotrope. Au niveau hypothalamique, la GH exerce un rétrocontrôle positif en stimulant la synthèse et la sécrétion de SRIF (Berelowitz et coll., 1981a) et un rétrocontrôle négatif en inhibant la synthèse du GHRH (Chomczynski et coll., 1988). Au niveau hypophysaire, la GH exerce un rétrocontrôle négatif sur sa propre sécrétion (Fraser et coll., 1991). (*Voir la Figure 1*)

1.1.4.2 L'IGF-I et la ghrelina

Au niveau hypophysaire, l'IGF-I agit en inhibant la sécrétion et l'expression du gène de la GH chez le rat (Berelowitz et coll., 1981b; Yamashita et Melmed, 1987) et chez l'humain (Yamashita et coll., 1986a). De plus, la ghrelina, une hormone peptidique, agit en stimulant la sécrétion de la GH chez ces deux espèces (Kojima et coll., 1999; Nakazato et coll., 2001). (*Voir la Figure 1*)

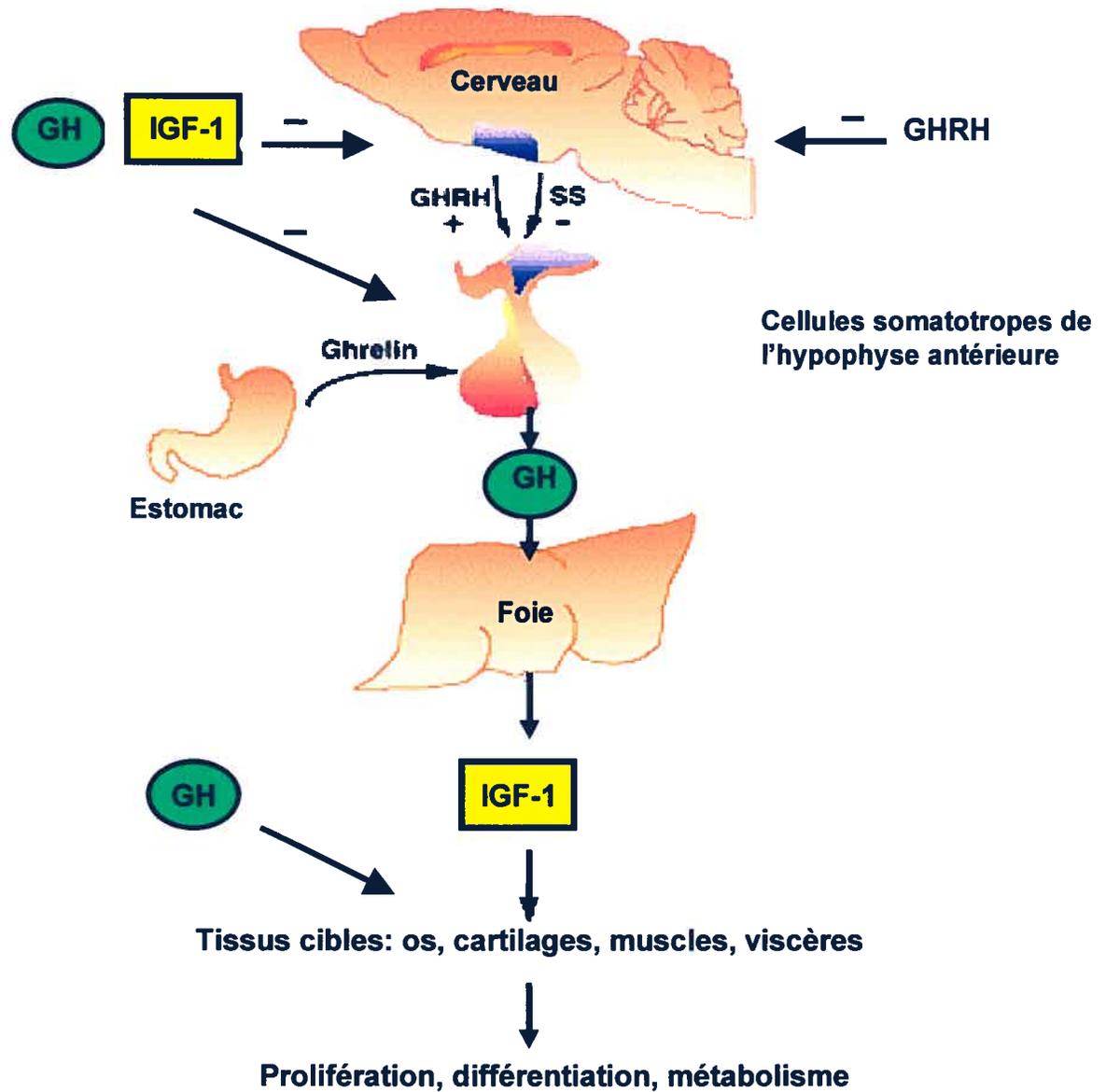


Figure 1 : Régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance dans la cellule somatotrope.

Tiré de : <http://www.biochem.northwestern.edu/mayo/Research2.html>.

1.1.4.3 Hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes influencent la transcription du gène de la GH et sa sécrétion. Au niveau hypothalamique, les oestrogènes inhibent la sécrétion de SRIF, ce qui résulte en une augmentation de celle de la GH, alors que les androgènes, tel que la testostérone, stimulent sa libération

(Devesa et coll., 1991). Les glucocorticoïdes semblent avoir deux effets opposés sur la régulation des niveaux de GH. D'une part, ils augmentent la transcription du gène (Evans et coll., 1982) et la stabilité de son ARNm (Paek et Axel, 1987). *In vitro*, dans les cellules hypophysaires, ils augmentent la libération basale de GH et celle stimulée par le GHRH (Nakagawa et coll., 1987). D'autre part, ils inhibent les neurones hypothalamiques du GHRH, spécialement à concentration élevée (Fernandez-Vasquez et coll., 1995) ou lors d'une stimulation soutenue (Lam et coll., 1997), et ils stimulent la libération de SRIF (Devesa et coll., 1991; Andreasen et coll., 1996). Les hormones thyroïdiennes stimulent la transcription du gène de la GH grâce à la présence d'éléments de réponse (TRE) sur celui-ci (Evans et coll., 1982; Casanova et coll., 1985; Koenig et coll., 1987).

1.1.4.4 Facteurs physiopathologiques

Chez l'humain, certains états physiopathologiques tels que le diabète de type 1 (Press et coll., 1984a, 1984b), l'hyperglycémie (Masuda et coll., 1985), l'anorexie nerveuse, les problèmes rénaux, le jeûne et les états de dénutrition protéique (Müller et coll., 1995a) provoquent une augmentation de la sécrétion de GH. Chez le rat, l'hyperglycémie a un effet inhibiteur sur la sécrétion de GH (Tannenbaum et Martin, 1976) qui pourrait résulter de la stimulation de sécrétion de SRIF (Berelowitz et coll., 1982; Murao et coll., 1994). L'obésité (Rudman et coll., 1981), l'hypothyroïdie et l'hyperthyroïdie diminuent la sécrétion de GH (Frohman et Jansson, 1986).

1.1.4.5 Mutations

Des mutations spécifiques de l'axe somatotrope, tel qu'une mutation du gène de la GH (Phillips et coll., 1982) ou du GH-R (Merimee et coll., 1989; Duquesnoy et coll., 1991) peuvent affecter la sécrétion de cette hormone. Des mutations pléiotropiques tel une mutation inactivatrice du facteur Pit-1 (Pellegrini-Bouiller et coll., 1996) ou une mutation dans la sous unité α de la protéine stimulatrice (Syndrome de McCune-Albright) (Spada et Vallar, 1992) affecte également la sécrétion de la GH.

1.1.5 Rôle de l'hormone de croissance

La GH joue un rôle dans la croissance et le développement des jeunes mammifères. Elle est nécessaire au maintien des fonctions anaboliques (Albertsson-Wikland et Rosberg, 1982) et de l'intégrité tissulaire et cellulaire chez l'adulte (Schwartz et Kostyo, 1981). Elle stimule la prolifération et la différenciation cellulaire de plusieurs tissus et organes incluant les os, les cartilages (Vogl et coll., 1993 ; Ohlsson et coll., 1998), les muscles et les viscères (Lonn et coll., 1996 ; Andreasen et coll., 1996). La GH stimule le dépôt de protéine dans les cellules chondrocytiques et ostéogéniques, augmente leur taux de réplication et stimule la conversion des chondrocytes en ostéocytes favorisant la formation de nouvel os (Aron et coll., 1997; Ohlsson et coll., 1998). Elle stimule l'entrée des aa dans les cellules et la synthèse des protéines (Knobil et Hotchkiss, 1964; Andreasen et coll., 1996). Elle tend à diminuer le catabolisme des protéines, en mobilisant les graisses comme source d'énergie efficace (Aron et coll., 1997). Elle stimule ainsi la lipolyse (Goodman, 1993 ; Andreasen et coll., 1996), conduisant à l'augmentation des concentrations en acides gras libres et à une diminution générale de la masse adipeuse. La GH est une hormone hyperglycémiant. Elle stimule la gluconéogenèse et augmente l'utilisation du glucose par les cellules (Umpleby et Russell-Jones, 1996; Aron et coll., 1997).

Une déficience en GH peut mener à une petite stature, un retard de maturation des os ou au nanisme chez l'enfant, et à une réduction de la masse maigre corporelle, une augmentation de l'adiposité, une diminution de la force musculaire et une perte de la qualité de vie chez l'adulte (Petersen S 2000). Un excès de GH entraîne le gigantisme chez l'enfant et l'acromégalie chez l'adulte (Jialal et coll., 1982).

1.2 FACTEUR DE LIBERATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE

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

En 1982, le GHRH a été isolé par deux groupes de recherche indépendants. À partir de tumeurs pancréatiques de patients atteints d'acromégalie (Guillemin et coll., 1982; Rivier et coll., 1982), trois formes moléculaires homologues de ce peptide ont été isolées, soit le GHRH(1-37)OH, le GHRH(1-40)OH et le GHRH(1-44)NH₂. Les deux formes les plus courtes étant homologues aux 37 et 40 premiers aa du GHRH(1-44)NH₂ et résultant de la protéolyse de ce dernier (Guillemin et coll., 1982). Des études *in vivo* ont démontré que ces peptides stimulent la sécrétion de la GH, la séquence bioactive minimale étant constituée de la portion N-terminale de 29 aa (Guillemin et coll., 1982; Rivier et col., 1982). La structure primaire du GHRH a également été identifiée chez plusieurs autres mammifères tel que le bœuf (Esch et coll., 1983), le porc (Böhlen et coll., 1983a), la chèvre et le mouton (Brazeau et coll., 1984), le rat (Mayo et coll., 1985a) et la souris (Frohman et coll., 1989).

Le GHRH appartient à la famille des hormones peptidiques incluant le glucagon, le peptide analogue au glucagon de type 1 (GLP-1), le peptide gastrique inhibiteur (GIP), le peptide histidine isoleucine (PHI), le peptide hypophysaire stimulateur de l'adénylate cyclase (PACAP), le peptide intestinal vasoactif (VIP) et la sécrétine (Campbell et Scanes, 1992). Des homologies de séquences, qui sont importantes pour leur activité biologique, sont retrouvées dans la portion N-terminale de ces peptides. Pour la plupart de ceux-ci, le domaine biologiquement actif est encodé dans un seul exon du gène (Mayo et coll., 1995).

1.2.2 Structure du gène et du précurseur du GHRH

Chez l'humain, le gène du GHRH est localisé sur le chromosome 20 (Mayo et coll., 1985b; Riddell et coll., 1985), tandis que chez la souris, on le retrouve sur

le chromosome 2 (Godfrey et coll., 1993). Sa longueur est d'environ 10 kb. Il est composé de six exons, dont quatre codant pour le préproGHRH. Ces exons sont utilisés avec l'un ou l'autre des deux exons alternatifs codant pour les séquences 5' non traduites et possèdent deux sites d'initiation de la transcription. L'utilisation de l'un ou l'autre de ces exons, ainsi qu'un processus d'épissage alternatif, permet de générer deux ARNm distincts dans l'hypothalamus et le placenta (Gonzalez-Crespo et Boronat, 1991; Mizobuchi et coll., 1991). Les deux ARNm possèdent des régions codantes identiques et codent pour des protéines précurseurs complètes du GHRH (Gonzalez-Crespo et Boronat, 1991; Mizobuchi et coll., 1991). 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 (Godfrey et coll., 1993).

L'ARNm du hGHRH encode un préproGHRH de 108 aa incluant un peptide signal, le GHRH(1-44), un signal d'amidation et un peptide carboxy-terminal. Lorsque le peptide signal est clivé, le proGHRH est transformé en GHRH(1-45) par une endopeptidase, et converti en GHRH(1-44)NH₂ par la peptidylglycine monooxygénase α -amidante (Frohman et coll., 1992). Une endopeptidase convertit le GHRH(1-44)NH₂ en GHRH(1-40)OH (Frohman et coll., 1990).

Chez le rat et la souris, l'ARNm du GHRH encode pour un précurseur de 104 et 103 aa, respectivement. Ils possèdent les caractéristiques structurales du précurseur humain, toutefois les peptides retrouvés chez les rongeurs n'ont pas de fonction carboxamide terminale, mais une fonction carboxylique libre (Mayo et coll., 1985a; Frohman et coll., 1989). Les peptides GHRH(1-42)OH et GHRH(1-43)OH retrouvés chez la souris et le rat présentent 62 et 67% d'homologie avec le GHRH(1-44)NH₂ humain, respectivement (Mayo et coll., 1985a; Frohman et coll., 1989).

1.2.3 Localisation du GHRH

Le noyau arqué est la principale source des neurones GHRHergique innervant l'éminence médiane. Le GHRH y est transporté à l'hypophyse antérieure *via* le système vasculaire porte. Sa sécrétion dans les vaisseaux portes contrôle la libération épisodique de GH (Petersen et coll., 2000). Un petit nombre de neurones GHRHergiques est localisé dans l'hypothalamus latérobasal au niveau du noyau ventromédiale, dorsomédiale et paraventriculaire (Daikoku et coll., 1986; Vandepol et coll., 1986; Petersen et coll., 2000). L'ARNm du préproGHRH a également été localisé dans le cortex, l'hypothalamus et le tronc cérébral (Matsubara et coll., 1995).

La présence du GHRH a aussi été détectée dans plusieurs tissus extrahypothalamiques. Entre autre, dans le système gastro-intestinal où son ARNm a été localisé (Bosman et coll., 1984; Shibasaki et coll., 1984; Matsubara et coll., 1995), plus précisément au niveau de la muqueuse épithéliale du jéjunum et du duodénum (Lehy et coll., 1986). De plus, un axe fonctionnel du GHRH-GH a été caractérisé dans la rate et le thymus de rat. Il a été démontré que les lymphocytes contiennent le GHRH et l'ARNm du préproGHRH (Guarcello et coll., 1991; Stephanou et coll., 1991). Ces derniers ont aussi été localisés dans le pancréas (Shibasaki et coll., 1984; Bosman et coll., 1984), le placenta, les ovaires et les testicules. Dans le placenta, l'ARNm du préproGHRH et le GHRH sont trouvés majoritairement au niveau du cytotrophoblaste, chez le rat (Margioris et coll., 1990) et des cellules trophoblastiques et dans le labyrinthe placentaire (Suhr et coll., 1989), chez la souris. Chez le rat et l'humain, l'ARNm du préproGHRH et le GHRH sont présent au niveau des ovaires (Moretti et coll., 1990; Bagnato et coll., 1992) et des testicules (Pescovitz et coll., 1990; Berry et Pescovitz, 1988; Moretti et coll., 1990). Dans les ovaires de rat, le GHRH est localisé dans les cellules granulososa (Moretti et coll., 1990; Bagnato et coll., 1992). Dans les testicules de rat, il est localisé principalement dans les cellules de Leydig (Ciampani et coll., 1992) et les cellules germinales (Srivastava et coll., 1993a). Finalement, une faible expression du GHRH a été détectée dans le cœur, le

poumon, le duodénum, l'intestin grêle, la glande surrénale, le muscle squelettique et le rein (médulla et pelvis) (Matsubara et coll., 1995).

1.2.4 Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du GHRH

L'activité biologique du GHRH est concentrée dans ces 29 premiers aa (Ling et coll., 1985). Chez le rat, des études de structure-affinité de différents fragments et analogues du GHRH ont permis de déterminer les éléments importants impliqués dans la liaison du GHRH à son récepteur (GHRH-R) hypophysaire. Les aa contenus dans le segment 13-21 du GHRH sont plus importants que ceux du segment 24-29 pour le maintien d'une haute affinité de liaison ou d'une conformation optimale permettant la liaison du GHRH (Gaudreau et coll., 1992). En effet, l'affinité du hGRF(1-29)NH₂ est diminuée drastiquement lorsque les aa Tyr¹, Ser⁹, Lys¹², Val¹³, Gly¹⁵, Gln¹⁶ ou Lys²¹ sont omis. Une perte d'affinité est également observée lors du remplacement des segments 13-15, 16-18 ou 19-21 par un groupement octanoyl. La délétion des aa Asn⁸, Gln²⁴, Asp²⁵, Ile²⁶, Met²⁷, et Ser²⁸ ou Arg²⁹ a un effet modéré à faible sur l'affinité de liaison du GHRH à son récepteur (Gaudreau et coll., 1992).

Dans l'hypophyse de rat, l'étude de l'affinité des analogues du hGHRH(1-29)NH₂ monosubstitués par son stéréo-isomère de forme D- ou une L-alanine a permis de déterminer que les résidus Ala⁴, Val¹³, Ala¹⁹ et Ile²⁶ sont impliqués dans le maintien de la structure du hGRF(1-29)NH₂ et favorisent une liaison optimale au récepteur, alors que les résidus Tyr¹, Asp³, Tyr¹⁰, Arg¹¹, Lys¹², Leu¹⁴, Leu¹⁷, Arg²⁹ et Lys²¹ sont responsables de l'affinité de liaison du ligand au GHRH-R. Ces études ont également démontré que les aa Ile⁵ et Phe⁶ sont importants pour la structure du GHRH et l'interaction avec le GHRH-R. Il est aussi suggéré que les résidus impliqués dans la liaison au récepteur soient requis pour son activation et la production d'AMPC (Lefrancois et coll., 1994). Dans des préparations membranaires de cellules rénales de bébé hamster (BHK) transfectées avec le hGHRH-R, les résidus Tyr¹, Asp³, Phe⁶, Tyr¹⁰, Arg¹¹, Lys¹², Leu¹⁴, Leu¹⁷, Arg²⁰, et Lys²¹ sont également impliqués dans la liaison du hGHRH(1-29)NH₂ au récepteur

natif. Les résidus Val¹³ et Ala¹⁹ pourraient être impliqués dans la liaison et le maintien d'une conformation optimale du hGHRH, permettant une liaison à haute affinité au récepteur natif (Andersen et coll., 1998). Un faible pourcentage d'homologie est présent entre le GHRH-R de rat et d'humain au niveau de leur domaine N-terminal et de la première boucle extracellulaire (Godfrey et coll., 1993), ce qui peut expliquer les différences de pharmacophores de liaison.

Des différences de structure-affinité du GHRH ont également été observées entre la médulla rénale (MR) et l'hypophyse. Une délétion des aa en position 1 et 2 diminue drastiquement l'affinité de liaison du hGHRH dans l'hypophyse (Ling et coll., 1984a), mais a peu d'impact dans la médulla (Boulanger et coll., 2002). Une délétion dans la portion centrale du rGHRH est moins délétère dans la MR que dans l'hypophyse (Lefrançois et coll., 1994). Finalement, une délétion en C-terminal conduit à une diminution substantielle de l'affinité dans la MR, mais son impact est moins important que dans l'hypophyse (Boulanger et coll., 1993, 2002). Des différences structurales au niveau du site de liaison du GHRH pourraient expliquer en partie ces observations.

1.2.5 Régulation de l'expression du GHRH

1.2.5.1 GH, IGF-I et ghrelina

Des taux élevés de GH dans le sang exercent un rétrocontrôle négatif sur la régulation de l'expression du gène du GHRH, mais des taux bas augmentent le préproGHRH (Frohman et coll., 1992). Chez les rats hypophysectomisés, les niveaux d'ARNm du préproGHRH sont augmentés de trois à quatre fois, sept jours (j) post-hypophysectomie (Chomczynski et coll., 1988) et normalisés, tel qu'observé chez le rat nain déficient en GH, suite à une thérapie de remplacement à la GH (Chomczynski et coll., 1988; Sato et coll., 1993). Les niveaux d'ARNm du préproGHRH sont également augmentés chez la souris *little* dont le GHRH-R hypophysaire comporte une mutation de l'Asp⁶⁰, ce qui le rend inactif et conduit à une déficience en GH (Frohman et coll., 1989). L'IGF-I, pour sa part, contrôle négativement la synthèse et la sécrétion du GHRH (Berolowitz et coll., 1981a). Récemment, il a été démontré que la ghrelina agit sur les neurones

GHRHergiques pour stimuler la sécrétion de GH *via* une voie GHRH-dépendante (Tannenbaum et coll., 2003).

1.2.5.2 Hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes

Les stéroïdes sexuels régulent l'expression du GHRH. Chez le rat mâle, la testostérone augmente le niveau d'expression du gène alors que les oestrogènes le diminuent (Zeitler et coll., 1990; Senaris et coll., 1992). Les niveaux d'ARNm du préproGHRH et du peptide mature sont plus élevés chez le mâle que la femelle (Argente et coll., 1991). Les glucocorticoïdes inhibent directement les neurones du GHRH dans le noyau arqué de l'hypothalamus, diminuant ainsi les niveaux d'ARNm du GHRH (Senaris et coll., 1996). Les hormones thyroïdiennes (T4) inhibent la sécrétion du GHRH dans l'hypothalamus (Miki et coll., 1992).

1.2.5.3 Peptides, hormones hypothalamiques et neurotransmetteurs centraux

Le GHRH exerce un rétrocontrôle négatif sur sa propre neurosécrétion en agissant au niveau du noyau arqué (Lumpkin et McDonald, 1989). Des études autoradiographiques et immunohistochimiques ont permis d'observer que les neurones libérant le GHRH sont innervés par les axones de neurones cathécholaminergiques (Sato et coll., 1989), enképhalinergiques (Daikoku et coll., 1988), substance Pergique et thyroïdolibérinergique (TRH) (Shioda et coll., 1987). Ce qui indique la possibilité d'un contrôle hypothalamique par ces hormones ou neurotransmetteurs de la sécrétion du GHRH. La galanine agit comme stimulateur des neurones GHRHergiques ce qui augmente la libération de la GH (Hulting et coll., 1991).

1.2.5.4 Facteurs physiologiques

Plusieurs facteurs physiologiques affectent le GHRH. Au cours du vieillissement, l'expression du gène du préproGHRH, son contenu hypothalamique et sa sécrétion diminue chez le rat (Ezzat et coll., 1991; Mayo, 1992; Girard et coll., 1999). Une diminution est aussi observée dans la sensibilité de l'hypophyse à répondre au GHRH (Ceda et coll., 1986; Szabo et coll., 1986; Styne, 1991; Ezzat

et coll., 1991). Le stress aigu régule à la hausse les niveaux d'ARNm du préproGHRH au niveau du système porte et augmente la sécrétion de GH (Cataldi et coll., 1994). Le jeûne (Bruno et coll., 1990, 1993; Brogan et coll., 1997), l'obésité (Maccario et coll., 2000) ainsi que le diabète (Bussiguina et coll., 2000) provoquent une diminution de l'expression de l'ARNm du préproGHRH.

1.2.6 Rôles du GHRH

1.2.6.1 Prolifération et différenciation

En plus de son rôle essentiel dans la stimulation de la synthèse et la sécrétion de la GH (Barinaga et coll., 1983; Billestrup et coll., 1986) dans l'hypophyse antérieure, le GHRH est impliqué dans la prolifération et la différenciation des cellules somatotropes (Billestrup et coll., 1986; Lin et coll., 1993; Dean et Porter, 1999). La croissance induite par le GHRH est médiée en partie par l'AMPc, et le niveau de celui-ci est un important facteur dans la détermination de l'activité mitogénique des cellules somatotropes (Billestrup et coll., 1986). Comme celles-ci prolifèrent centralement en hypophyse antérieure mature, le GHRH est requis pour poursuivre la réplication de ces cellules (Petersenn et coll., 1998). Pendant le développement, le GHRH est un important régulateur physiologique de la sécrétion de GH (Wehrenberg et coll., 1986). Toutefois, certains aspects du développement ne sont pas dépendant de ce peptide (Korytko et coll., 1996). Par exemple, les cellules somatotropes de l'hypophyse se différencient en absence de GHRH hypothalamique (Hemming et coll., 1984).

Le GHRH stimule également la prolifération des cellules épithéliales de l'intestin (Lehy et coll., 1986) et celle des lymphocytes dans la rate et le thymus (Guarcello et coll., 1991). Il stimule la croissance placentaire et contribue à la croissance fœtale (Margioris et coll., 1990; Gonzalez-Crespo et Boronata, 1991). L'expression de son ARNm est augmentée pendant la période de gestation chez le rat (Pescovitz et coll., 1991) et la souris (Suhr et coll., 1989), suggérant qu'il soit impliqué dans la régulation de la sécrétion de GH fœtale (Wehrenberg, 1986a; Spatola et coll., 1991) ou dans la régulation paracrine des fonctions placentaires, tel que la sécrétion de lactogène (Hochberg et coll., 1988). Il pourrait également

réguler la production des autres hormones placentaires et exercer des effets directs sur la croissance et la différenciation cellulaire du fœtus (Mayo et coll., 1996a).

Au niveau du pancréas, le GHRH semble être impliqué directement dans la sécrétion de l'insuline, du glucagon et de la SRIF (Bosman et coll., 1984 ; Hermansen et Kappelgaard, 1987; Green et coll., 1990). Dans les gonades, il agit comme un régulateur autocrinien de la fonction cellulaire ovarienne et testiculaire (Margioris et coll., 1990 ; Gonzalez-Crespo et Boronata, 1991). Dans les ovaires de rat et d'humain (Bagnato et coll., 1992; Pescovitz et coll., 1990), le GHRH est produit localement et stimule la maturation folliculaire (Bagnato et coll., 1992; Moretti et coll., 1990). Il agit directement pour augmenter la stimulation de la folliculostimuline (FSH) dans la fonction ovarienne (Moretti et coll., 1990). Chez la vache, il stimule la prolifération cellulaire des granulosa et augmente la production laitière (Lapierre et coll., 1988). Dans les testicules, au niveau des cellules de Leydig, le GHRH module la stéroïdogénèse (Ciampani et coll., 1992), tandis que dans cellules Sertoli, il stimule la production AMPc et l'expression du gène c-fos (Srivastava et coll., 1993b).

Au niveau du rein, un contrôle neuroendocrinien a été proposé dans l'oxygénation médullaire (Matsubara et coll., 1995). Plusieurs hormones et neuromédiateurs comme l'angiotensine, la dopamine, l'endothéline, les prostatglandines et la vasopressine contrôlent le flux sanguin et le transport tubulaire dans les anses de Henlé épaisses de la médulla. Comme l'ARNm du préproGHRH a été détecté dans la médulla, il a aussi été proposé que le GHRH puisse être impliqué dans ces fonctions (Matsubara et coll., 1995).

1.2.6.2 Contrôle de l'appétit et du sommeil

Des études réalisées chez le rat ont démontré que le GHRH stimule la prise alimentaire en agissant sur le noyau suprachiasmatique et l'aire préoptique médiale durant la période nocturne et diurne, sachant que la période d'obscurité est celle où les rats consomment 80% de leur ration quotidienne (Dickson et

Vaccarino, 1990; Feifel et Vaccarino, 1989; Vaccarino et coll., 1991). Le GHRH stimule préférentiellement la consommation de protéines, mais ne semble pas avoir d'effet sur la prise de glucide (Dickson et Vaccarino, 1994). Chez les rats Lou âgés, le GHRH augmente la prise protéique en agissant directement ou indirectement sur l'hypothalamus (Veyrat-Durebex et coll., 2001).

Le GHRH joue un rôle dans la régulation du sommeil tant chez le rat que chez l'humain (Ehlers et coll., 1986; Obál et coll., 1991; Van Cauter et coll., 1992). Les niveaux d'ARNm du GHRH sont réduits chez les rats en déficit de sommeil (Zhang et coll., 1999). La région préoptique de l'hypothalamus serait impliquée dans cette régulation puisqu'une injection intrapréoptique du GHRH provoque une augmentation de la durée et de l'intensité du sommeil de type REM (mouvement oculaire rapide) (Zhang et coll., 1999).

1.3 RECEPTEUR HYPOPHYSAIRE DU FACTEUR DE LIBERATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE

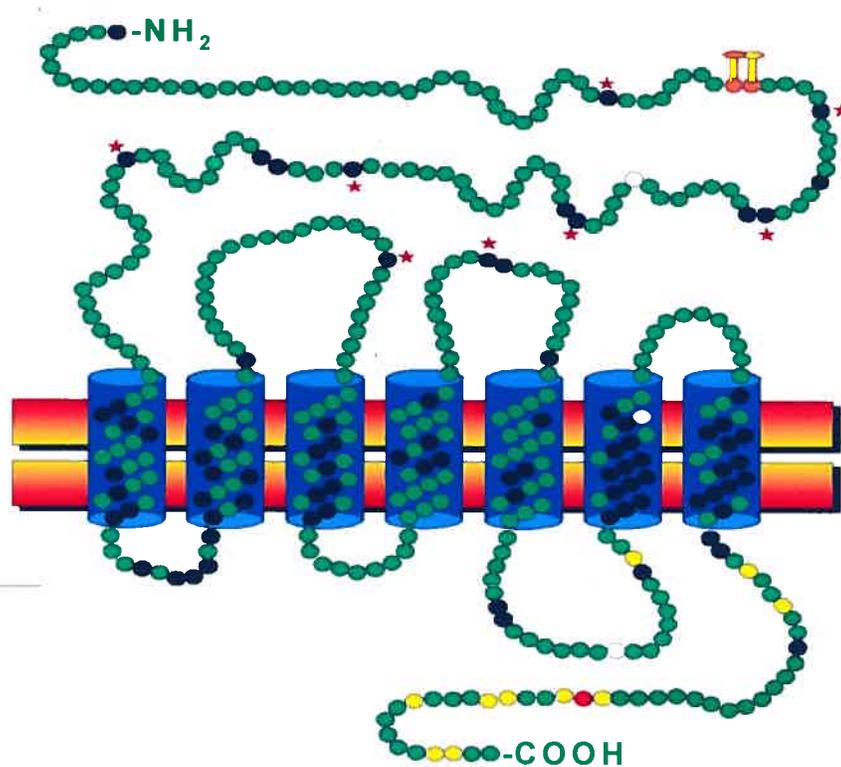
1.3.1 Structure du récepteur hypophysaire du GHRH

Le GHRH-R a été cloné dans l'hypophyse antérieure chez l'humain (Mayo, 1992; Tang et coll., 1995; Hashimoto et coll., 1995; Gaylin et coll., 1993), le rat, la souris (Lin et coll., 1992), le porc (Hassan coll., 2001; Hsiung et coll., 1993), le bœuf et le mouton (Horikawa et coll., 2001). Il a aussi été cloné à partir d'adénomes hypophysaires humains (Tang et coll., 1995; Hashimoto et coll., 1995; Gaylin et coll., 1993). Une forte homologie de séquences existe entre le GHRH-R de ces différents mammifères, soit 94% d'homologie entre les récepteurs de souris et de rat, et 82% entre le GHRH-R humain et ceux des rongeurs (Mayo, 1992). Chez le porc, le GHRH-R présente 80, 82 et 86 % d'homologie avec celui de souris, de rat et d'humain, respectivement (Hsiung et coll., 1993). Chez le mouton, le GHRH-R présente 93, 84, 81, 76 et 74% d'homologie lorsque comparé à celui retrouvé chez le bœuf, le porc, l'homme, le rat et la souris (Horikawa et coll., 2001). Chez l'humain, le rat, la souris et le porc, le GHRH-R est une protéine de

423 aa, tandis que chez le mouton, elle est de 407 aa. La taille moléculaire prédite du GHRH-R humain et de rat est de 47 kDa (Mayo, 1992; Gaylinn et coll., 1994a).

Le clonage du GHRH-R dans l'hypophyse antérieure de différents mammifères a permis de confirmer qu'il appartient à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Segre et Goldring, 1993; Kowlakowski, 1994), et plus spécifiquement à la sous-famille B-III, tel que le récepteur de la sécrétine (Ishihara et coll., 1991), du VIP (Ishihara et coll., 1992), du GLP-1 (Thorens, 1992), du PACAP (Pisegna et Wank, 1993), du glucagon (Jelinek et coll., 1993), du GIP (Usdin et coll., 1993) et du CRF (Chen et coll., 1993). Ces récepteurs sont similaires aux récepteurs de l'hormone parathyroïde (PTH) (Juppner et coll., 1991), du peptide apparenté à la PTH (Abou-Samra et coll., 1992) et de la calcitonine (Lin et coll., 1991). Ils se caractérisent par un long domaine extracellulaire N-terminal. Le GHRH-R possède 35% et 40% d'homologie de séquence avec le récepteur de la sécrétine et celui du VIP, respectivement. Il possède également 24-31% d'homologie avec les récepteurs hypophysaires du PACAP, de la calcitonine, du PTH, du GLP-1 et du GIP (Segre et Golgring, 1993).

En plus des sept domaines transmembranaires (DTM), le GHRH-R possède un ou plusieurs sites potentiels de glycosylation dans la région N-terminale (Mayo, 1992; Andreasen et coll., 1996; De Almeida et Mayo, 1998), des sites potentiels de phosphorylation dans la troisième boucle cytoplasmique et la région C-terminale (Mayo, 1992), ainsi que plusieurs aa hautement conservés dans les sept DMT (Mayo et coll., 1996b) (Figure 2). Il contient huit Cys dont celles retrouvées dans la deuxième et la troisième boucle extracellulaire qui pourraient participer à la formation de ponts disulfures. Celle dans la région C-terminale intracytoplasmique pourrait être palmitoïlée (Mayo, 1992; Mayo et coll., 1996b). Les Cys et les ponts disulfures jouent un rôle critique dans la structure et la fonction de cette famille de récepteur (Laburthe et coll., 1996; Mayo et coll., 1996b).



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

Figure 2 Structure du GHRH-R hypophysaire de rat.

Tiré de : Thèse de C Boisvert (2003) Localisation, régulation et fonction du récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat

Plusieurs résidus sont aussi conservés dans le domaine extracellulaire N-terminal de la sous famille BIII des GPCR : 6 Cys, 1 Asp, 1 Try et 1 Gly (Segre et Golgring, 1993). Des études de mutagenèse des récepteurs du GHRH, VIP et glucagon ont montré qu'une délétion d'un de ces aa donne une protéine qui présente une faible capacité de liaison pour son ligand endogène (Gaudin et coll., 1995 ; Couvineau et coll., 1995 ; Unson et coll., 1995 ; De Almeida et Mayo 1998 ; Godfrey et coll., 1993 ; Lin et coll., 1993). Des études du GHRH-R chez la souris *little* ont montré qu'une mutation de l'Asp⁶⁰ en Gly réduit drastiquement l'affinité de liaison du GHRH et la fonctionnalité du récepteur (Lin et coll., 1993 ; Gaylinn et

coll., 1994). Le domaine N-terminal exercerait également un rôle important dans l'interaction initiale du récepteur avec son ligand (Mayo et coll., 1996b). Une interaction entre la région de l'hélice- α du domaine N-terminal du récepteur et la région hélice- α du GHRH en serait responsable. Le segment 26-40 du domaine N-terminal du GHRH et le segment 13-23 du GHRH seraient impliqués dans cette interaction (Momany et coll., 1996). Les résidus des boucles extracellulaires et les DTM seraient aussi impliqués dans des interactions secondaires avec le ligand, permettant une liaison plus spécifique du GHRH au récepteur (De Almeida et Mayo, 1998 ; Holtmann et coll., 1995). Ainsi l'intégrité de la région N-terminale du GHRH-R est essentielle pour la liaison du ligand. Toutefois, le domaine N-terminal ou les DTM avec la région C-terminale intracellulaire seuls ne suffisent pas à l'obtention d'une liaison optimale du GHRH à son récepteur (De Almeida et Mayo, 1998).

Les modifications post-traductionnelles rencontrées sont connues pour influencer les processus de désensibilisation et d'internalisation des GPCR (Cotecchia et coll., 1990; Kjelsberg et coll., 1992; Stephan et Blumer, 1994; Bouvier et coll., 1994). Dans l'hypophyse de rat, de récentes études, à l'aide d'un agoniste fluorescent du GHRH, ont montré que l'internalisation du GHRH-R hypophysaire, suite à une stimulation par le GHRH, nécessite une acylation par des acides gras comme pré-requis à une internalisation *via* une voie cavéoline-dépendante (Veyrat-Durebex et coll., 2004). La structure primaire du GHRH-R ainsi que sa concentration au niveau de la membrane cellulaire auraient un rôle important à jouer dans les processus d'internalisation et l'adressage intracellulaire du GHRH-R (Veyrat-Durebex et coll., 2004).

1.3.2 Structure du gène du récepteur hypophysaire du GHRH

Chez l'humain, le gène du GHRH-R a été localisé sur le bras court du chromosome 7 (7p14) (Gaylinn et coll., 1994b) ou 7p15 (Wajnrach et coll., 1994). Son analyse a révélé la présence de 10 à 13 exons répartis sur 8 à 15 kb d'ADN génomique (Petersen et coll., 1998 ; Petersen et Schulte, 2000). La taille moyenne des exons est environ 100 pb alors que celle des introns est de 126 à 4708 pb (Petersenn et Sculte, 2000).

Chez la souris, le gène du GHRH-R a été localisé sur le chromosome 2 (Campbell et Scanes, 1992) ou le chromosome 6 (Lin et coll., 1993). Il est constitué de 13 exons et sa taille est d'environ 10 kb (Lin et coll., 1993).

Chez le rat, le gène du GHRH-R a une structure similaire à celui chez la souris. Toutefois, il est constitué de 14 exons répartis sur environ 15 kb (Miller et coll., 1999 ; Mayo et coll., 1996b) et possède également un exon alternatif (exon 11) (Miller et coll., 1999). La taille des exons peut varier de 42 à 456 pb, tandis que celles des introns varie de 111 pb à plus de 2 kb. La séquence codante du domaine extracellulaire N-terminal est contenue dans les exons 1-4 alors que les exons 5-14 codent pour les domaines transmembranaires, les boucles intra et extracellulaires et le domaine C-terminal (Nogami et coll., 2002).

1.3.2.1 Sites d'initiation de la transcription

Le promoteur du GHRH-R a un faible contenu en GC, un motif de boîte GC en position -210 est présent. Toutefois, il ne contient pas d'élément potentiel requis pour l'initiation de la transcription soit une boîte TATA, CAAT ou d'autres séquences initiatrices consensus dans la région promotrice d'intérêt tel qu'observé chez plusieurs GPCR (Petersenn et coll., 1998). Il est ainsi classé dans la même famille que le promoteur du gène de l'enzyme déoxynucléotidyl transférase terminale. Plusieurs promoteurs de cette famille sont régulés pendant la différenciation et le développement (Petersenn et coll., 1998).

Chez l'humain, plusieurs sites d'initiation de la transcription du gène du GHRH-R ont été identifiés à 40 nucléotides (nt) en amont du codon initiateur ATG (Petersen et coll., 1998). Un site majeur d'initiation de la transcription, situé à 40 pb (Petersen et coll., 1998) ou 122 pb (Rekasi et coll., 2001), a été identifié par essai de protection à la RNase (RPA). Un codon Met qui forme le codon d'initiation a été identifié dans l'ADNc du GHRH-R humain, ainsi qu'un signal consensus de polyadénylation (AATAAA) en 3' (10 nt avant la séquence poly A terminale) (Petersenn et coll., 1998). Une étude des premiers 2 kb du promoteur

humain a permis d'identifier que la portion minimale requise pour l'expression du GHRH-R est de 202 pb (Petersenn et coll., 1998). Toutefois, un promoteur de 1456 pb est nécessaire pour provoquer un niveau d'expression élevé (Petersenn et coll., 1998).

Chez le rat, trois sites majeurs d'initiation de la transcription ont été identifiés aux positions 84, 93 et 286 pb en amont du site initiateur de la traduction. Un site d'initiation mineur a aussi été observé en position 203 (Miller et coll., 1999). Un 5^{ème} site d'initiation a été identifié en position -105 pb du site d'initiation de la traduction (Nogami et coll., 2002).

1.3.2.2 Sites de liaisons pour les facteurs de transcription

L'analyse du promoteur du hGHRH-R a permis de déceler la présence de plusieurs sites potentiels de liaison pour les facteurs de transcription de base, ceux spécifiques aux tissus et ceux induits par des stimuli exogènes. Les facteurs de transcription de base identifiés dans ce promoteur sont Nf-1, USF et SP-1 (Petersenn et coll., 1998). En position -355, -294 et -107, des séquences consensus pour NF-1 ont été détectées (Petersenn et coll., 1998). En position -406, un site de liaison pour l'USF a été identifié (Petersenn et coll., 1998). Les facteurs de transcription spécifique aux tissus identifiés dans ce promoteur sont Brn-2 (*brain-2*), Pit-1 et GHF-1 (facteur de croissance-1). Le facteur de transcription Brn-2, spécifique aux neurones, a un site de liaison en position -700 (Petersenn et coll., 1998). Les facteurs Pit-1 et GHF-1, spécifiques à l'hypophyse, ont trois sites de liaison en position -1009, -799 et -127 (Petersenn et coll., 1998). Cette dernière position semble être la plus importante pour une expression spécifique du GHRH-R dans l'hypophyse antérieure. Un 4^{ème} site de liaison a été déterminé pour Pit-1 entre les positions -171 et -160 (Iguchi et coll., 1999). L'activité du promoteur du gène du GHRH-R est augmentée suite à la cotransfection de Pit-1 dans des cellules fibroblastiques rénales de singes (COS-7), une lignée cellulaire n'exprimant pas Pit-1 (Fraser et coll., 1992). Finalement la région promotrice du GHRH-R contient des sites de liaison de facteurs de transcription induits par des stimuli exogènes tel AP-1 et -4, CREB (facteur de

transcription se liant à l'élément de réponse de l'AMPC), ERE (récepteur des oestrogènes) et NF- κ B (facteur nucléaire- κ B). Deux sites de liaison ont été identifiés pour AP-1 en positions -991 et -609. Toutefois, un seul site a été mis en évidence pour AP-4 en position -28, pour CREB en position -483 et pour NF- κ B en position -429 (Petersenn et coll., 1998).

Chez le rat, des éléments de réponses ont été identifiés pour les facteurs de transcription spécifiques aux tissus tel GATA, CREB, Ets-1 (*transcription factor E26 transformation-specific-1*) et C/EBP α (*CCAAT/Enhancer-binding protein alpha*) (Miller et coll., 1999). Il y a un site de liaison pour Ets-1 en position -1058, deux sites pour Pit-1, en position -245 et -230, et C/EBP α , en position -1508 et -880, et 8 sites pour GATA en position -1538, -1145, -712, -632, -221, -16, +126 et +215 (Miller et coll., 1999; Nogami et coll., 2002). Enfin, les éléments de réponses pour le facteur CREB sont retrouvés dans la région promotrice du gène suggérant qu'ils puissent médier, dans l'hypophyse, la régulation à la baisse, AMPC-dépendante, de l'expression du GHRH-R par le GHRH (Aleppo et coll., 1997).

1.3.2.3 Éléments de réponses aux hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes

Dans la région promotrice du gène du GHRH-R, on retrouve des éléments de réponses pour les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. Des études *in vitro* de l'activité du promoteur du hGHRH-R ont mis en évidence la présence d'un élément de réponse négatif aux oestrogènes dans la région -202 à -108 pb, et d'un élément de réponse positif aux glucocorticoïdes dans la région -1456 à -1181 pb (Petersen et coll., 1998). Chez le rat, des sites de liaison ont été observés pour les récepteurs aux glucocorticoïdes et aux oestrogènes (Miller et coll., 1999). L'existence d'un élément de réponse aux hormones thyroïdiennes a aussi été proposée (Mayo et coll., 1996). Des études plus récentes ont permis d'identifier deux éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes, dont un est fonctionnel dans la région -221 à -204pb (Nogami2002p1318). Un élément de réponse fonctionnel à l'acide rétinoïque a également été identifié dans la région -1090 à -1074 (Nogami et coll., 2002).

1.3.3 Isoformes du récepteur hypophysaire du GHRH

Dans l'hypophyse humaine normale et dans les adénomes hypophysaires produisant la GH, trois transcrits d'ARNm du GHRH-R ont été identifiés (Hashimoto et coll., 1995). La taille de ces transcrits est de 2.0, 2.8 et 4.5 kb. Le plus abondant (2.0 kb) correspondant au récepteur de 423 aa. Lorsque celui-ci est transfecté dans les cellules COS-7, il provoque une accumulation de l'AMPc suite à une stimulation par le GHRH (Hashimoto et coll., 1995). Les transcrits de 2.8 et 4.5 kb, exprimés de façon prédominante dans les adénomes, génèrent des récepteurs tronqués au niveau de la troisième boucle intracytoplasmique. Leur séquence codante comporte un codon stop qui provoque la terminaison prématurée de la traduction avant le sixième DTM. Ils correspondent au 326 et 325 premiers aa du récepteur de 423 aa. Celui de 2.8 kb possède une extension de 12 aa en C-terminal. Lorsque les cellules COS-7 sont transfectées avec le transcrit de 4.5 kb, il n'y a pas de production d'AMPc induit par le GHRH. De plus, ce transcrit peut interférer avec le GHRH-R fonctionnel pour diminuer la production d'AMPc stimulée par le GHRH et agit comme dominant négatif (Motomura et coll., 1998). Trois isoformes, résultant d'un épissage alternatif de l'intron 11, ont été identifiés (Tang et coll., 1995). Leur taille partielle est de 1.3, 1.7 et 1.8 kb. Le plus abondant est celui de 1.3 kb et correspond au GHRH-R. Ceux de 1.7 et 1.8 kb sont le résultat d'une insertion de 400 pb et 500 pb, respectivement, en position 1025 du transcrit d'ARNm du GHRH-R. Ces isoformes donneraient naissance à un GHRH-R de 325 et 338 aa, respectivement (Tang et coll., 1995).

Dans des tumeurs hypophysaires humaines, plus précisément des somatotrophinomes, une isoforme du GHRH-R a été décrite comme étant un polymorphisme naturel, où l'Ala⁵⁷ est remplacé par une Thr (Adams et coll, 2000). Les résultats ont permis d'émettre l'hypothèse que des formes alternatives du GHRH-R puissent conférer une sensibilité accrue au GHRH et que l'aa en position 57, situé dans le domaine N-terminal extracellulaire, soit important pour la liaison du GHRH (Adams 2000 p33).

Dans des lignées cellulaires cancéreuses humaines pancréatiques (MiaPaC-2) et prostatiques (LNCaP) (Rekasi et coll., 2000), quatre isoformes (SV_{1,2,3,4}) du GHRH-R humain ont été identifiées par RT-PCR. Ces isoformes possèdent des caractéristiques communes soit l'absence des trois premiers exons et la présence de l'intron 3. Il existe plus de 99% d'homologie entre l'isoforme SV1 (*splice variant 1*) et la séquence du gène humain pour la région nucléotidique 77 à 1383 (exons 4-13). La seule portion de l'ADNc qui diffère correspond aux 334 pb de l'intron 3 à l'extrémité 5'. Une délétion des sites potentiels de glycosylation et des six premières Cys du domaine N-terminal extracellulaire est aussi observée. L'isoforme SV2 est un récepteur résultant de la présence d'un codon stop prématuré dans l'exon 8. L'isoforme SV3 possède quant à elle une séquence protéique complètement différente puisque son site d'initiation de la traduction est décalé. L'absence de l'intron 3 déplace le site d'initiation de la transcription dans l'exon 6. L'isoforme SV4 est dépourvue des exons 5, 6 et 7. La structure des isoformes SV2, 3, et 4 diffère de celle du GHRH-R identifiée par Gaylinn (Gaylinn et coll., 1993) et Mayo (Mayo, 1992). La taille de l'ARNm de ces isoformes est de 566 pb, 390 pb et 335 pb, respectivement, résultant en une protéine de 145 aa, 151 aa et 68 aa. Rekasi et coll. (2000) ont rapporté la présence de l'isoforme SV1 et SV2 dans les cellules cancéreuses de prostate, de poumon, du sein, d'ovaire et dans les cellules normales de foie et de la prostate. SV1 a aussi été détectée dans les cellules normales pancréatiques. SV3 et SV4 sont exclusivement exprimées dans les cellules humaines prostatiques normales et dans les cellules d'adénomes hypophysaires humaines, respectivement (Rekasi 2000p10561).

Chez le rat, deux isoformes principaux du GHRH-R ont été identifiées dans l'hypophyse antérieure et y sont présents en concentrations variables (Mayo, 1992; Zeitler et coll., 1998). La forme courte de 423 aa est prédominante dans l'hypophyse antérieure de rat et est de taille identique au GHRH-R humain, de souris et de porc (Mayo, 1992). Elle correspond au récepteur fonctionnel natif à haute affinité pour le GHRH (Mayo, 1992; Zeitler et coll., 1998), et il a été proposé que seule celle-ci puisse provoquer la production d'AMPc, suite à une stimulation par le GHRH (Zeitler et coll., 1998). Une forme de 464 aa, générée par épissage

alternatif, aurait une affinité plus faible pour le GHRH. Elle présente une insertion de 41 aa au niveau de la troisième boucle intracytoplasmique, juste avant le sixième domaine transmembranaire (Mayo, 1992). Une deuxième isoforme de 480 aa, possédant une insertion de 41 aa au niveau de la troisième boucle intracytoplasmique, une substitution des cinq derniers aa de l'extrémité C-terminale, ainsi qu'une addition de 17 aa a été documentée (Zeitler et coll., 1998). Lorsqu'elle est exprimée dans les cellules COS ou cancéreuses humaines (Hela), elle provoque l'accumulation d'AMPc intracellulaire suite à une stimulation au GHRH (Zeitler et coll., 1998).

Chez la souris, trois isoformes du GHRH-R ont été isolées dans l'hypophyse. L'une correspond à la forme de 423 aa et les deux autres présentent une insertion au même site que chez le rat ou une délétion des nt codant pour la première boucle extracellulaire (Lin et coll., 1992). L'isoforme avec une insertion peut, suite à la liaison au GHRH, stimuler la production d'AMPc (Lin et coll., 1992).

Chez le porc, deux isoformes du GHRH-R hypophysaire ont été isolées (Hassan, 2001). Un GHRH-R de 423 aa qui est 88% homologue au récepteur humain et un de 451 aa, qui serait généré par épissage alternatif de l'ARNm (Hsiung et coll., 1993; Hassan et coll., 1995; Hassan, 2001). Seul les 418 premiers aa sont identiques à la forme native du récepteur (423 aa). L'isoforme de 451 aa contient 28 aa supplémentaires en C-terminal, ainsi que deux Cys qui sont différentes de la forme native. Cette isoforme génère un récepteur ayant une affinité de liaison plus faible pour le GHRH que le GHRH-R natif qui se traduit par une production plus faible d'AMPc (Hassan, 2001).

Chez la brebis, la forme de 423 aa du GHRH-R n'existe pas. Seule une isoforme de 407 aa, correspondant aux 407 premiers aa de la forme native du récepteur est retrouvée (Horikawa et coll., 2001). Cette isoforme résulte d'une mutation en position 408 de la séquence codante du GHRH-R. Celle-ci crée un codon stop prématuré en modifiant le Trp (TCG en TGA), induisant une délétion de 16 aa en C-terminal. Cette mutation augmente la sensibilité du GHRH à stimuler

la production d'AMPC suggérant que le domaine C-terminal contrôle l'efficacité de signalisation de la voie adénylate cyclase. De plus, six sites de phosphorylation sont éliminés suite à cette mutation, ce qui pourrait provoquer une inhibition de la régulation négative du récepteur *via* son internalisation ou son inefficacité à se coupler à la protéine G (Horikawa et coll., 2001). Grâce au séquençage de l'ADN génomique, cette mutation a également été identifiée dans l'hypophyse de chèvre (Horikawa et coll., 2001).

1.3.4 Localisation tissulaire du récepteur du GHRH

Par hybridation *in situ*, l'ARNm du GHRH-R a été localisé exclusivement dans le lobe antérieur de l'hypophyse (Gaylinn et coll., 1994b). Il a aussi été colocalisé avec l'ARNm du facteur de transcription Pit-1 (Mayo, 1992). Des études d'immunocytochimie ont démontré que le GHRH-R est limité aux cellules somatotropes et colocalisé avec la GH chez l'humain et le rat (Morel et coll., 1999).

L'ARNm du GHRH-R a été localisé dans l'hypothalamus, plus précisément dans sa portion antérieure soit les noyaux périventriculaire, arqué et ventromédial (Vandepol et coll., 1986; Takahashi et coll., 1995). Il n'a toutefois pas été identifié dans le noyau paraventriculaire (Collu et coll., 1997). Cette localisation supporte l'idée d'un mécanisme de rétrocontrôle par le GHRH (Aguila et McCan, 1991). Le cervelet, le cortex et le tronc cérébral contiennent également cet ARNm, mais à un niveau beaucoup plus faible que l'hypophyse antérieure (Matsubara et coll., 1995; Vandepol et coll., 1986).

L'utilisation de la technique de RT-PCR a permis de détecter l'ARNm du GHRH-R dans plusieurs autres tissus chez le rat, soit la glande thyroïde, le cœur, le poumon, le duodénum, l'intestin grêle, le côlon, la rate, la glande surrénale, le rein (cortex, médulla, pelvis), l'urètre, l'épididyme, le muscle squelettique (Matsubara et coll., 1995). Il a aussi été localisé dans le placenta humain (Mayo et coll., 1996a) et de rat (Takahashi et coll., 1995), ainsi que dans les ovaires et les testicules (Mayo et coll., 1985b). L'estomac, le foie et les tissus adipeux n'expriment pas le GHRH-R.

Parmi ces tissus, le rein représente le seul tissu extrahypophysaire contenant une concentration suffisante d'ARNm du GHRH-R permettant une détection sans amplification (Matsubara et coll., 1995). Par hybridation *in situ* et par essai RPA, le GHRH-R et son ARNm ont été localisés plus spécifiquement au niveau des cellules de l'anse de Henle mince (aHm) de la MR (Boisvert et coll., 2002). Bien que la séquence partielle de l'ADNc du GHRH-R rénal révèle une homologie complète avec celui hypophysaire, il est suggéré que l'entité protéique soit différente dans l'hypophyse et la médulla (Boulanger et coll., 2002). De plus, au cours du développement, le profil d'expression des niveaux d'ARNm du GHRH-R est différent dans les deux tissus (Boisvert et coll., 2002). La présence d'un dimorphisme sexuel a été suggéré dans la médulla (Boisvert et coll., 2002) tel que dans l'hypophyse (Ono et coll., 1995). L'importance physiologique des ces GHRH-R extrahypophysaires n'est pas encore complètement connue.

1.3.5 Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du récepteur du GHRH

1.3.5.1 Tissu hypophysaire

Avant le clonage du GHRH-R, des études de radioliation ont été utilisées pour le caractériser dans l'hypophyse de différents mammifères. En 1985, des études à l'aide du radioligand $[\text{His}^1, ^{125}\text{I-Tyr}^{10}, \text{Nle}^{27}]\text{hGHRH}(1-32)\text{NH}_2$ ont révélé la présence d'une classe de sites de liaison à haute affinité dans l'hypophyse antérieure de rat et de bœuf ainsi que dans des adénomes hypophysaires humains (Seifert et coll., 1984, 1985; Veliçelebi et coll., 1985 ; Ikuyama et coll., 1988). Des études subséquentes de saturations dans des homogénats d'hypophyse antérieure de rat avec le radioligand $[\text{I}^{125}\text{-Tyr}^{10}]\text{hGHRH}(1-44)\text{NH}_2$ ont mis en évidence la présence de deux classes de sites de liaison pour le GHRH: une classe de haute affinité et basse capacité, et une classe de basse affinité et haute capacité (Aribat et coll., 1990 ; Lau et coll., 1991).

Le complexe ligand-récepteur a été caractérisé par des études de réticulation chimique chez plusieurs mammifères. Dans l'hypophyse de rat, elles

ont révélé la présence d'un complexe de 75 kDa avec le ^{125}I -h(GHRH(1-40)OH (Veliçelebi et coll., 1986) et de 26 kDa avec le $[\text{His}^1, ^{125}\text{I-Tyr}^{10}, \text{Nle}^{27}]$ hGHRH(1-32)NH₂ (Zysk et coll., 1986). Avec le $[\text{Tyr}^{10}]$ hGHRH(1-44)NH₂, des complexes protéiques de 27 et 42 kDa ont été détectés dans ce tissu (Guarcello 1991 et coll.). Plus récemment, des entités 28, 47 et 65 kDa ont été identifiées avec le $[\text{Tyr}^{10}]$ hGHRH(1-44)NH₂. Par immunodétection, une protéine de 54 kDa a été identifiée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la portion C-terminale (aa 404-421) du GHRH-R (Fujinaka et coll., 1996). Par immunobuvardage, des entités de 44, 47 et 65 kD dans l'hypophyse de rat ont été visualisés avec le $[\text{His}^1, ^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$ hGHRH(1-44) NH₂ (Boulanger et coll., 1999). L'entité de 65 kDa pourrait représenter une forme longue du GHRH-R ou une forme glycosylée. L'entité de 28 kDa pourraient résulter d'une protéolyse du complexe ^{125}I -GHRH-GHRH-R durant le processus de réticulation (Boulanger et coll., 2002). Celle de 44 et 47 kDa correspondrait à la forme décrite par Mayo (1992).

Dans l'hypophyse humaine, une protéine de 50 kDa a été identifiée par immunodétection (Fujinaka et coll., 1996). Des protéines de 52 et 57 kDa ont également été mises en évidence par immunobuvardage (Boulanger et coll., 1999), lesquelles pourraient représenter un GHRH-R de 47 kDa modifié de façon post-traductionnelle (Mayo, 1992). Des études de réticulation chimiques ont révélé la présence de complexes de 55 kDa dans des préparations membranaires de cellules HEK 293 (lignées de cellules embryonnaires rénales humaines) transfectées avec le hGHRH-R (Gaylinn et coll., 1994a). Des complexes de 35, 45 et 72 kDa ont aussi été identifiés dans des préparations membranaires de cellules BHK 570, transfectées avec le hGHRH-R (Boulanger et coll., 1999). Une affinité de liaison plus grande du GHRH pour le complexe de 45 kDa a été suggérée suite à une diminution plus grande du signal radioactif de cette entité en présence de 1 μM de hGHRH(1-29)NH₂ (Boulanger et coll., 1999).

Chez le boeuf, des études ont révélé la présence d'entités de 31 (Veliçelebi et coll., 1986) et 55 kDa (Gaylinn et coll., 1994; Zysk et coll., 1996). Une déglycosylation complète de cette dernière la transforme en une entité de 45 kDa,

indiquant que ce récepteur est N-glycosylé (Gaylinn et coll., 1994). Dans l'hypophyse de mouton, un complexe protéiques de 55 kDa a été identifié grâce au développement d'un analogue photoactivable du hGHRH(1-32)NH₂ (Gaylinn et coll., 1994). Après déglycosylation, la taille moléculaire du complexe est réduite à 45 kDa (Gaylinn et coll., 1994).

1.3.5.2 Tissus extrahypophysaires

En 1990, Moretti et coll. (1990) ont mis en évidence un site de liaison pour le hGHRH(1-32)NH₂ dans les ovaires. Comme ce site a une affinité similaire pour le GHRH et VIP, il a été suggéré que le GHRH-R ovarien puisse être différent de celui dans l'hypophyse. Un site à haute affinité a été mis en évidence dans le thymus et la rate en utilisant le [¹²⁵I-Tyr¹⁰]hGHRH(1-44)NH₂ (Guarcello et coll., 1991). Dans le rein, des études de liaison avec le même radioligand ont mis en évidence la présence d'un seul site réversible et saturable (Boulanger et coll., 2002). Des études d'immunobuvardage ont permis de déterminer une taille apparente de 52 kDa pour le récepteur rénal (Fujinaka et coll., 1996). Par réticulation chimique, des complexes de 38, 55 et 65 kDa ont été identifiés dans la MR (Boulanger et coll., 2002). Les différences observées entre les caractéristiques de liaison, incluant celles de profil de structure-affinité, du [¹²⁵I-Tyr¹⁰]hGHRH(1-44)NH₂ dans l'hypophyse et la MR ne peuvent s'expliquer complètement par la différence de température entre les deux types de radioliasion (23°C pour l'hypophyse, 4°C pour la MR). Des modifications post-traductionnelles, telle que la glycosylation, pourraient modifier les patrons de structure-affinité, ce qui expliquerait la différence observée.

1.3.6 Régulation de l'expression du récepteur du GHRH

1.3.6.1 GHRH et IGF-I

Le GHRH peut contrôler positivement ou négativement l'expression du GHRH-R. Pendant la période néonatale, le GHRH hypothalamique est requis pour maintenir les niveaux d'ARNm du GHRH-R (Horikawa et coll, 1996a). Chez les rats nouveau-nés, une immunisation passive du GHRH diminue drastiquement les niveaux d'ARNm du GHRH-R (Horikawa et coll., 1996a). Chez les rats de deux

mois, un traitement de 14 j au GHRH(1-29)NH₂ permet d'augmenter ou de diminuer le nombre de sites de liaison du GHRH-R en fonction du dosage utilisé (Wehrensberg et coll., 1986b; Girard et coll., 1998). Le GHRH *via* la production d'AMPc pourrait donc provoquer une inhibition de la production du GHRH-R en réduisant la synthèse et l'accumulation de son ARNm en augmentant sa dégradation (Petersenn et coll., 1998; Miki et coll., 1996; Aleppo et coll., 1997). Des études plus récentes ont suggéré que l'effet du GHRH sur l'expression du GHRH-R puisse dépendre de plusieurs facteurs tel que la durée d'exposition au GHRH et le stade de développement de l'hypophyse (Lasko et coll., 2001). Dans le rein, des études *in vitro* ont mis en évidence l'existence d'une régulation négative des niveaux d'ARNm du GHRH-R par le GHRH. Il a été proposé qu'elle soit aussi médiée par un mécanisme dépendant de l'AMPc (Boisvert et coll., 2002). Finalement, Sugihara et coll. (1999) ont proposé que l'IGF-I agisse directement au niveau de l'hypophyse antérieure pour inhiber l'expression du GHRH-R en inhibant celle du facteur de transcription Pit-1 (Lin et coll., 1993; Sugihara et coll., 1999).

1.3.6.2 Hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes

Les stéroïdes sexuels contrôlent l'expression du GHRH-R. Chez le rat mâle, la testostérone augmente les niveaux d'ARNm du GHRH-R au cours de la maturation sexuelle (Korytko et coll., 1996), alors que les oestrogènes les diminuent (Lam et coll., 1996). Chez la rate ovariectomisée, les niveaux d'ARNm du GHRH-R augmentent, mais diminuent après un traitement de substitution aux oestrogènes (Lam et coll., 1996). Chez le mâle castré, ces niveaux sont également diminués (Ono et coll., 1995). Chez les rats nouveau-nés et jeunes, les niveaux ne sont pas différents entre les deux sexes (Kamegai et coll., 1999). Toutefois, chez des rats âgés (70 j), les niveaux d'ARNm du GHRH-R sont plus élevés que chez la femelle (Boisvert et coll., 2002). Les glucocorticoïdes contrôlent à la hausse les niveaux d'ARNm du GHRH-R. Ils auraient une action positive directe au niveau du promoteur du gène, dans les cellules adénohypophysaires (Miller et Mayo, 1997). Chez les rats surrénalectomisés, un traitement à la corticostérone ou à la dexaméthasone font augmenter les niveaux d'ARNm du GHRH-R (Miller et Mayo, 1997; Tamaki et coll., 1996).

Les hormones thyroïdiennes exercent une action positive sur le GHRH-R dans les cellules somatotropes chez l'humain et le rat (Miki et coll., 1995; Tam et coll., 1996; Andreasen et coll., 1996). Dans l'hypophyse, une hypothyroïdie diminue les niveaux d'ARNm du GHRH-R et de sa protéine (Miki et coll., 1995; Tam et coll., 1996; Boulanger et coll., 1999). La concentration des sites de liaison à haute et basse affinité est aussi diminuée (Boulanger et coll., 1999). Un traitement avec T4 ou T3 reverse cet effet, et augmente les niveaux d'ARNm du GHRH-R (Korytko et Cuttler, 1997; Miki et coll., 1995; Tam et coll., 1996). Il est proposé que ces hormones agissent directement sur le gène du GHRH-R (Miki et coll., 1995; Tam et coll., 1996).

Une action synergique positive des glucocorticoïdes avec les hormones thyroïdiennes et l'acide rétinoïque a également été rapportée (Nogami et coll., 2000). Celle-ci pourrait s'expliquer par une hétérodimérisation des récepteurs aux glucocorticoïdes avec ceux des hormones thyroïdiennes ou de l'acide rétinoïque, induisant ainsi une modulation de leur activité (Leid et coll., 1992).

1.3.6.3 Facteurs physiologiques

Au cours du développement, le GHRH-R est régulé différenciellement. Chez le rat, les plus hauts niveaux d'ARNm du GHRH-R sont observés quelques jours avant la parturition (Korytko et coll., 1996). Après la naissance, ces niveaux diminuent jusqu'à 12 j, puis augmentent pour atteindre un maximum à l'âge de la maturité sexuelle (30 j). Subséquemment, ces niveaux diminuent avec l'âge (Korytko et coll., 1996). Une étude récente a démontré qu'à 3 et 12 j, ces niveaux d'ARNm du GHRH-R étaient élevés et diminuaient à 45 et 70 j (Boisvert 2000).

Au cours du vieillissement, les niveaux de GHRH-R sont contrôlés à la baisse. En effet, chez les rats âgés de 8 à 18 mois, les entités de 47 et 65 kDa de ce récepteur hypophysaire sont diminuées alors que celle de 44 kDa n'est pas affectée (Gaudreau et coll., 1999a). Le transcrit de 2.5 kb du GHRH-R diminue à 18 mois, tandis que celui de 4 kb augmente entre 8 et 18 mois (Gaudreau et coll.,

1999a). Les paramètres de liaison du GHRH sont également affectés avec l'âge. Chez le rat de 8 mois, le nombre de sites de liaisons à haute affinité diminue. À 14 mois, ceux à basse affinité augmentent de façon transitoire et à 18 mois, ceux à haute affinité disparaissent et le nombre total de sites diminue (Abribat et coll., 1991; Lefrançois et coll., 1995). Ainsi, la diminution de sécrétion de GH en réponse au GHRH au cours du vieillissement peut être en partie expliquée par les altérations du GHRH-R. Dans la MR, les niveaux d'ARNm du GHRH-R diminuent avec le vieillissement, mais ils sont compensés par une augmentation de la taille du rein, laquelle double de poids entre 2 et 18 mois (Boulanger et coll., 2002).

1.3.7 Voies de signalisation du GHRH-R

La liaison du GHRH à son récepteur hypophysaire peut stimuler trois voies de signalisation soit la voie adénylate cyclase (AC)-AMPc-protéine kinase A (PKA), la voie phosphatidylinositol (IP)/protéine kinase C (PKC) et la voie des MAPK. Ces voies de signalisation sont également présentes dans le rein et plus particulièrement l'AMPc-PKA et la PKC ont été observées dans les cellules de aHm ascendante (Terada et coll., 1995; Takahashi et coll., 1995; Gambaryan et coll., 1996). Les voies de signalisation impliquées dans la cellule somatotrope en réponse au GHRH sont représentées à la *Figure 3*.

1.3.7.1 Voie adénylate cyclase-AMPc-protéine kinase A

La voie AC-AMPc-PKA constitue la voie principale de signalisation du système GHRHergique dans l'hypophyse. L'activation de l'AC et la production d'AMPc permettent une activation de la PKA, ce qui a pour résultat la phosphorylation de différentes cibles protéiques, dont les canaux calciques de la membrane cytoplasmique, stimulant leur ouverture et l'entrée de calcium (Ca^{2+}) extracellulaire nécessaire à l'exocytose de la GH (Cuttler et coll., 1992; Lussier et coll., 1991a,b; Frohman, 1996). Elle active également des canaux cationiques non-sélectifs ou des canaux sodiques insensibles à la tétrodothine, conduisant à une dépolarisation et à l'ouverture des canaux calciques (Kato et coll., 1992; Sartin et coll., 1996; Chen et coll., 2000). L'accumulation intracellulaire de Ca^{2+} s'en suit

(Cuttler et coll., 1992 ; Lussier et coll., 1991a,b). Elle permet également la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription CREB qui constitue une composante régulatrice clé des cellule somatotopes (Mayo et coll., 1996a). L'AMPc est également impliquée dans la prolifération cellulaire des somatotopes (Billestrup et coll., 1986).

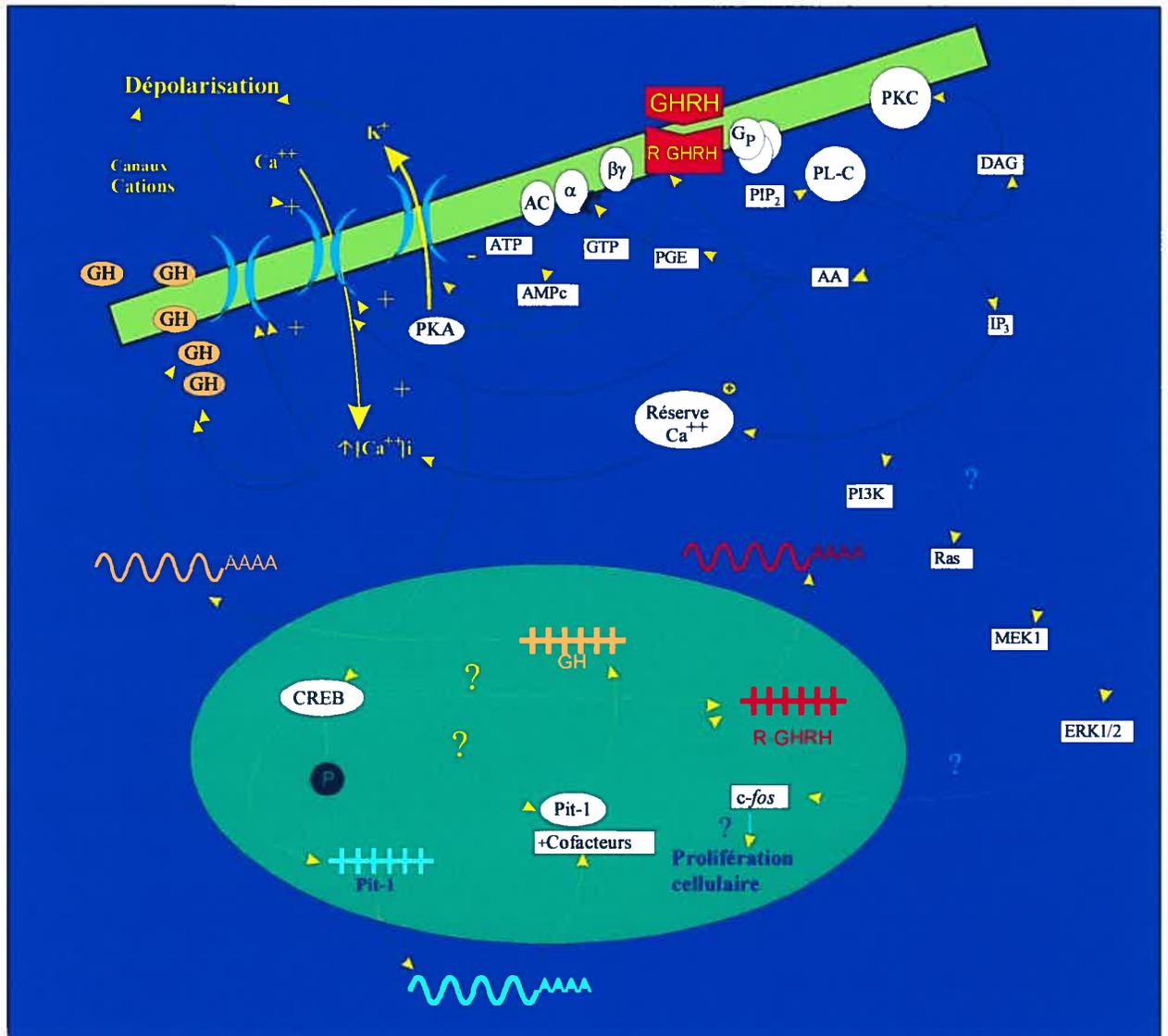


Figure 3 Voies de signalisation impliquées dans la cellule somatotrope en réponse au GHRH.

Tiré de : Thèse de C Boisvert (2003) Localisation, régulation et fonction du récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat.

1.3.7.2 Voie phosphatidylinositol/protéine kinase C

La voie inositol phosphate-diacylglycerol (DAG)-PKC peut aussi être impliquée dans la médiation des réponses au GHRH. La liaison du GHRH à son récepteur initie l'hydrolyse du phosphatidylinositol-biphosphate (PIP₂) par la phospholypase C (French et coll., 1990). Les produits de l'hydrolyse, le DAG et IP₃, servent de substrats endogènes pour l'activation de PKC et la mobilisation du Ca²⁺ emmagasiné dans le réticulum endoplasmique. Le DAG induit la translocation de la PKC du cytosol à la membrane cellulaire, et provoque une augmentation de son affinité au Ca²⁺ (Lussier et coll., 1991). Comme dans le cas de l'AC, la PKC entraîne une augmentation des niveaux d'AMPC intracellulaire et favorise ainsi l'entrée du Ca²⁺ dans la cellule (Gordeladze et coll., 1989 ; French et coll., 1989). Ces événements mènent à la sécrétion de GH dans les cellules somatotropes tel que démontré dans des études *in vitro* où la voie PKC a été stimulée (Judd et coll., 1986 ; Ohmura et Friesen, 1985). Toutefois, il a été mis en évidence que la voie PKC ne soit pas essentielle à la sécrétion de GH stimulée par le GHRH (French et coll., 1989 ; Lussier et coll., 1991).

1.3.7.3 Voie des « mitogen-activated protein kinase »

Des études récentes ont démontré que le GHRH active la voie des MAPK, dans l'hypophyse antérieure de rat et dans la lignée cellulaire d'ovaire de hamster chinois (CHO) surexprimant le GHRH-R (Pombo et coll, 2000), et mène à la prolifération cellulaire (Zeitler et Siriwardana, 2000 ; Lee et coll., 2001). Cette activation implique la phosphorylation d'intermédiaires de la voie MAPK (Zeitler et Siriwardana, 2000). De plus, l'activation de cette voie par le GHRH est abolie en présence d'un inhibiteur de la MEK1 (MAP/ERK Kinase I) (Zeitler et Siriwardana, 2000).

1.3.8 Rôles du GHRH-R

1.3.8.1 Rôle hypophysaire

Dans l'hypophyse antérieure, le GHRH-R est impliqué dans la synthèse et la sécrétion de la GH (Kovacs et coll., 2002). Plusieurs études ont aussi démontré son importance dans la prolifération et la différenciation des cellules somatotropes.

En effet, sans le GHRH-R, les cellules somatotropes ne peuvent proliférer ni se différencier (Lin et coll., 1993). Chez la souris *little*, où le GHRH-R est muté, le nombre de cellules somatotropes et la production de GH est faible (Lin et coll., 1993). Chez l'humain, des mutations du GHRH-R provoquent une déficience sévère en GH et le nanisme (Maheshwari et coll., 1998 ; Baumann et Maheshwari, 1997 ; Hayashida et coll., 2000 ; Netchine et coll., 1998), appuyant ainsi l'hypothèse d'un rôle de ce récepteur dans la prolifération et la différenciation. Au cours du développement embryonnaire chez les mammifères, le GHRH-R pourrait être impliqué dans la différenciation des cellules somatotropes (Dean et Porter, 1999). Dans les adénomes hypophysaires, le rôle du GHRH-R demeure à être élucidé (Hashimoto et coll., 1995; Lopes et coll., 1997). Il a été suggéré qu'il puisse agir comme protooncogène (Pama et coll., 1993).

1.3.8.2 Rôle extrahypophysaire

Des premières études dans l'hypothalamus ont révélé un rôle du GHRH-R dans la régulation de l'appétit au niveau du noyau suprachiasmatique (Vaccharino et coll., 1986), de même qu'un rôle dans la stimulation de la synthèse et de la sécrétion de la SRIF par le GHRH, au niveau du noyau périventriculaire (Aguila et McCann, 1985; Aguila, 1994; West et coll., 1997). Plus récemment, un rôle somnogénique au niveau des régions préoptique et olfactive a été proposé (Zhang et coll., 1999; Obál et coll., 2001). La localisation du GHRH-R dans la rate et le thymus suggère également un rôle dans les fonctions immunitaires, incluant la prolifération leucocytaire et lymphocytaire (Guarcello et coll., 1991). Au niveau du tractus gastro-intestinal, l'activation du GHRH-R par le GHRH favorise la prolifération de la muqueuse gastroduodéale (Konturek et coll., 1988).

Dans le rein, il a été proposé que le GHRH-R soit impliqué dans les fonctions autocrines et/ou paracrines en relation avec l'oxygénation médullaire (Matsubara et coll., 1995). Sa localisation au niveau des cellules de l'aHm ascendante, a permis de proposer un rôle pour ce récepteur dans le transport d'électrolytes de façon directe et/ou dans l'expression ou la régulation de la fonction de protéines impliquées dans le processus de concentration de l'urine

(Boisvert et coll., 2002; Matsubara et coll., 1995). Il pourrait également médier, comme dans les cellules somatotropes, la prolifération et/ou la différenciation cellulaire des cellules de l'aH (Boisvert et coll., 2002).

1.4 AXE SOMATOTROPE ET DIABETE

1.4.1 Définition du diabète de type 1 et 2

Le diabète consiste en une incapacité d'utiliser et d'emmagasiner les glucides alimentaires. L'insuline, une hormone polypeptidique produite par les cellules β du pancréas, contrôle la quantité de glucides emmagasinés ou métabolisés dans les cellules. Le diabète de type 1 ou insulino-dépendant est causé par une destruction des îlots de Langerhans qui synthétisent l'insuline. On l'appelle aussi diabète "maigre", car l'un des premiers symptômes est l'amaigrissement, ou encore "juvénile" puisqu'il se manifeste chez les enfants. Le diabète de type 2 ou non insulino-dépendant résulte d'une résistance à l'insuline et d'une diminution de la sécrétion de l'insuline. On l'appelle aussi le diabète "gras", puisqu'il survient souvent chez l'adulte vers la cinquantaine et plus particulièrement chez les personnes ayant un surpoids (Karam, 1997).

1.4.2 Fonction somatotrope et diabète de type 1

L'axe somatotrope est impliqué dans le diabète, tant chez l'humain que chez le rat. Chez une personne en santé, la sécrétion diurne de GH est supprimée par l'hyperglycémie (Parker et Rossman, 1971). Toutefois, l'hyperglycémie chronique dans le diabète de type 1 est paradoxalement incapable de supprimer une augmentation de sécrétion de GH (Pal et coll., 1993). Ainsi chez l'humain diabétique, les niveaux de GH sont élevés (Pal et coll., 1993). Chez le rat diabétique, une suppression de la sécrétion (Tannenbaum, 1981), une perte des pics de sécrétion de haute amplitude (Tannenbaum, 1981; Berelowitz et coll., 1996), une diminution de la synthèse et du contenu hypophysaire en GH (Gonzalez et Jolin, 1985; Robinson et coll., 1987; Boujon et coll., 1995) ainsi qu'une diminution des niveaux de GH plasmatique (Tannenbaum, 1981; Boujon et coll., 1995) ont été rapportés. Une diminution de la synthèse de GH hypophysaire pourrait être attribuée à une réduction marquée dans l'expression du gène de la

GH (Bedo et coll., 1991) et à la diminution du nombre de cellules somatotropes (Boujon et coll., 1995). Une diminution des niveaux d'ARNm du GH-R a aussi été observée dans l'hypophyse des rats diabétiques (Bussiguina et coll., 2000).

Chez le rat diabétique de type 1, ces effets pourraient résulter d'une augmentation de sécrétion de la SRIF ou de son activité (Welsh et Szabo, 1988; Boujon et coll., 1995), ou d'une diminution de sécrétion ou d'activité du GHRH (Locatelli et coll., 1984, 1985; Serri et Brazeau, 1987). Des études *in vitro*, chez le rat normal, ont montré qu'une élévation de la concentration de glucose inhibe la sécrétion du GHRH et de SRIF hypothalamique (Lewis et coll., 1989; Renier et coll., 1990). Chez le rat diabétique, les niveaux hypothalamiques d'ARNm du GHRH ainsi que la sécrétion de GHRH sont diminués, toutefois aucun changement n'a été observé dans le contenu hypothalamique en GHRH (Olchovsky et coll., 1990). D'autres études ont rapporté que le contenu en GHRH était augmenté à 2 et 4 jours post-streptozotocine (STZ) (Leidy et coll., 1995), suivie d'une diminution significative (Leidy et coll., 1995; Bussiguina et coll., 2000). La sécrétion de SRIF hypothalamique demeure inchangée (Makino et coll., 1977; Patel et coll., 1978; Olchovsky et coll., 1990) ou diminue chez les rats diabétiques (Richardson et Twente, 1987). Toutefois, d'autres études ont montré que le contenu plasmatique de SRIF augmente (Patel et coll., 1978; Joanny et coll., 1992). Il a été proposé que la SRIF dans le sang puisse donc (Patel et coll., 1980; Tannenbaum, 1981) ou non (Ndon et coll., 1992) jouer un rôle dans la diminution de la sécrétion de GH au cours de l'évolution du diabète. Il a également été proposé que la diminution de la GH plasmatique soit due à une déficience du mécanisme d'entreposage de la GH et/ou de sa synthèse, plus que de l'action de SRIF sur les cellules hypophysaires (Bluet-Pajot et coll., 1983). La concentration en SRIF dans le pancréas, l'estomac et le colon est également augmentée (Patel et coll., 1980) au cours du diabète. De plus, chez les rats diabétiques la liaison de SRIF à son récepteur est diminuée (Berelowitz et coll., 1996).

Au niveau du rein, l'hypertrophie rénale et glomérulaire sont observées dans le diabète humain ou expérimental à l'aide de modèles animaux (Hostetter et coll.,

1981; Osterby et coll., 1975). Une augmentation des niveaux d'ARNm du GH-R rénal a été observée chez le rat diabétique (Menon et coll., 1994). Celle-ci semble être tissu-spécifique puisque les niveaux d'ARNm du GH-R diminuent dans le cœur et le foie, suite à l'induction du diabète (Menon et coll., 1994). D'autres études n'ont révélé aucune différence entre les niveaux d'ARNm du GH-R de rats diabétiques et témoins, 7 jours post-induction du diabète, indiquant un rôle du GH-R à un stade précoce de la croissance rénale (Fervenza et coll., 1997).

1.4.3 IGF-I et son récepteur

La régulation d'IGF-I chez le rat diabétique apparaît être tissu-spécifique. En effet, ses niveaux sont augmentés dans l'hypophyse antérieure, mais diminuent dans l'hypothalamus, le foie et les testicules (Olchovsky et coll., 1990, 1991). Dans les poumons, les niveaux d'ARNm d'IGF-I ne sont toutefois pas affectés (Catanese et coll., 1993). Chez l'humain et le rat diabétique, les niveaux d'IGF-I sanguin sont diminués (Olchovsky et coll., 1990, 1991; Winter et coll., 1979; Cohen et coll., 1977; Merimee et coll., 1984; Fagin et coll., 1989), ce qui pourrait résulter principalement d'une diminution de la synthèse d'IGF-I dans le foie (Fagin et coll., 1989). Suite à un traitement à l'insuline, les niveaux d'IGF-I sont restaurés (Fagin et coll., 1989).

Au niveau du rein, l'IGF-I a été localisé dans les cellules de l'aHm et épaisse (Andersson et coll., 1988a,b), mais absent du glomérule et du tubule proximal (Rasch, 1984). Plusieurs études ont proposé un rôle pour l'IGF-I dans la prolifération et l'hypertrophie glomérulaire et tubulaire au cours du diabète (Flyvberg et coll., 1990; Matejka et Jennische, 1992). Il y aurait une forte association entre la sévérité du diabète, l'hypertrophie rénale et le contenu rénal en IGF-I (Flyvberg et coll., 1990a; Muchanete-Kubara et coll., 1994). Les niveaux rapportés d'ARNm de l'IGF-I varient entre les études, diminuant (Phillip et coll., 1994), augmentant (Bach et coll., 1992; Catanese et coll., 1993) ou demeurant inchangés (Flyvberg et coll., 1990a) dans les quatre premiers jours suivant l'induction du diabète. Les divergences pourraient s'expliquer en partie par la sévérité du diabète (Catanese et coll., 1993). Chez les rats diabétiques, suite à

l'administration de la STZ, les niveaux d'IGF-I rénaux augmentent et atteignent leur plus haut niveau 48 h post-STZ (Flyvberg et coll., 1988). Elle se produit concurremment à une diminution d'IGF-I hépatique (Bornfeldt et coll., 1989) et sanguin (Scheiwiller et coll., 1986), et précède la croissance rénale qui est significative après 4 j de diabète. Les niveaux d'IGF-I sont normalisés subséquemment malgré la persistance d'une croissance rénale bien que moins importante. Un traitement à l'insuline prévient la croissance rénale ainsi que l'élévation des niveaux d'IGF-I rénaux (Flyvberg et coll., 1990a). Il a donc été proposé qu'IGF-I soit impliqué dans la croissance rénale initiale, mais ne soit pas impliqué dans le maintien de l'hypertrophie rénale provoquée par le diabète de type 1. Sept jours post-STZ, une diminution des niveaux d'ARNm d'IGF-I a été observée dans le rein (Bornfeldt et coll., 1989 ; Bach et coll., 1991 ; Phillip et coll., 1994), et plus spécifiquement dans les cellules épithéliales de l'aH ascendante épaisse (Price et coll., 1997). L'augmentation d'IGF-I à court terme pourrait être attribuée à une régulation traductionnelle, une séquestration rénale de l'IGF-I ou une diminution de la dégradation de ce peptide (Flyvberg et coll., 1990a). D'autres auteurs ont suggéré que l'accumulation d'IGF-I rénal résulterait d'un changement d'affinité de liaison à son récepteur plutôt que d'une augmentation de sa synthèse (Phillip et coll., 1994). Toutefois les résultats d'études de liaison réalisées chez le rat diabétique demeurent contradictoires (Bach et coll., 1992 ; Werner et coll., 1990 ; Marshall et coll., 1991).

L'implication de l'IGF-I et de la GH dans le sang, dans les changements morphologiques rénaux, a pu être élucidée grâce à des études réalisées chez des rats nains diabétiques. Cette lignée présente une déficience en GH observée par un contenu hypophysaire de 5 à 10% de la normale ainsi que des concentrations réduites d'IGF-I sanguin et tissulaire (Charlton et coll., 1988). L'hypertrophie rénale des rats nains diabétiques est moins importante et plus lente que celle des rats diabétiques témoins, suggérant que la GH serait impliquée dans ce processus (Flyvberg et coll., 1992 ; Gronbaek et coll., 1997). De plus, il semblerait 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 (Flyvberg et

coll., 1992). En effet, l'hypertrophie rénale est partiellement renversée suite à l'administration de GH à des rats nains diabétiques, et aucun effet n'est observé sur les niveaux d'IGF-I sanguin ou rénaux (Flyvberg et coll., 1992).

1.5 JUSTIFICATION DE L'ETUDE

Le GHRH-R est fortement exprimé dans l'hypophyse antérieure et la MR constitue le tissu extrahypophysaire qui renferme les niveaux les plus élevés. Récemment, en utilisant une approche de co-localisation immunocytochimique, à l'aide de marqueurs spécifiques de la portion descendante et ascendante des cellules de l'aHm purifiées, le GHRH-R a été localisé dans la partie ascendante mince. Chez le rat, des études de structure-affinité réalisées dans l'hypophyse et la médulla rénale ont montré que le GHRH-R avait la capacité de lier le GHRH, et que cette liaison était spécifique, saturable et réversible (Boulangier et coll., 1999, 2002). Le profil de structure-affinité de divers analogues du GHRH est cependant différent dans ces deux tissus. Des études de réticulation chimique ont montré une hétérogénéité entre les poids moléculaires apparents des complexes obtenus dans l'hypophyse et la médulla rénale. Dans ces tissus, les transcrits d'ARNm du GHRH-R sont régulés par le GHRH, de même que dans certains états physiologiques tel que le développement et le vieillissement.

Au cours de l'évolution du diabète de type 1 chez le rat, plusieurs perturbations de l'axe somatotrope ont été rapportées. Dans l'hypophyse, une diminution du nombre de cellules somatotropes (Boujon et coll., 1995), de la synthèse de GH hypophysaire (Bedo et coll., 1991) et des niveaux d'ARNm du GH-R (Bussiguina et coll., 2000) sont observés. Le contenu hypothalamique en GHRH augmente très tôt dans cette pathologie, mais diminue par la suite (Leidy et coll., 1995). Dans le rein, une hypertrophie rénale et glomérulaire est observée lors du diabète (Hostetter et coll., 1981). Il semblerait que le GH-R (Menon et coll., 1994; Fervenza et coll., 1997) et l'IGF-I (Flyvberg et coll., 1988, 1990) soient impliqués dans la croissance rénale initiale puisque leurs niveaux sont augmentés très tôt au cours de cette pathologie, mais ne soit pas impliqué dans le maintien de l'hypertrophie rénale provoquée par le diabète de type 1. Certaines études

demeurent néanmoins contradictoires. Toutefois, aucune étude n'a été réalisée sur le GHRH-R au cours de l'évolution du diabète de type 1, bien que ce récepteur exerce un rôle crucial dans la médiation des actions du GHRH.

Le GHRH-R hypophysaire et rénal pourrait être affecté pendant l'évolution de cette pathologie et jouer un rôle important sur la sensibilité des cellules somatotropes au GHRH, en influençant la sécrétion de GH et la prolifération cellulaire. Ainsi, l'objectif du présent projet de recherche a été de quantifier les niveaux d'ARNm du GHRH-R et de sa protéine dans l'hypophyse et les cellules de aHm semi-purifiées (sp) chez des rats diabétiques de type 1, en fonction de la durée et de la sévérité du diabète. Afin de répondre à cet objectif, un diabète de type 1 a été induit chez des rats Sprague Dawley par injection à la STZ. Ce modèle a été utilisé puisque les modifications de son métabolisme et de son système endocrinien sont documentées dans la littérature. La STZ détruit les cellules β du pancréas et empêche ainsi la production d'insuline. Les rats post-STZ développent, tel que chez l'humain diabétique, des dommages affectant plusieurs organes tel que les yeux, les reins, le cœur, les vaisseaux sanguins et le système nerveux central et périphérique (Biessel et coll., 2002). Un modèle de diabète de courte (2 et 21 jours post-STZ) et longue durée (60 jours post-STZ) ont été utilisés afin de documenter les effets de l'évolution et de la sévérité du diabète sur la régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R et de sa protéine. Pour faciliter les études comparatives, la durée du diabète a été déterminée en fonction des études antérieures portant sur l'axe somatotrope. La régulation de l'expression de l'ARNm du GHRH-R ainsi que le récepteur lui-même ont été étudiés au cours du développement de la maladie dans l'hypophyse et la MR, afin d'étudier les modifications transcriptionnelles et traductionnelles. Les niveaux d'ARNm ont été analysés par buvardage northern dans l'hypophyse et par RPA dans le rein, tandis que les niveaux du GHRH-R ont été étudiés par réticulation chimique du complexe radioligand-récepteur et SDS-PAGE. Afin de réaliser cette étude dans les cellules de l'aHm, un dosage par radioligand dans des homogénats de cellules de l'aH sp a été mis au point. Les résultats de cette mise au point sont présentés à l'annexe I. Finalement, afin d'avoir plus d'information sur les effets directs de

l'hyperglycémie sur le GHRH-R, des études d'internalisation *in vitro* ont été réalisées dans des cellules hypophysaires et des cellules BHK exprimant le hGHRH-R, en utilisant un agoniste fluorescent du GHRH. En effet, la glucotoxicité cellulaire pourrait représenter un mécanisme important de la régulation du GHRH-R au cours de cette pathologie.

Les résultats de cette étude ont permis la rédaction d'un manuscrit qui est présenté dans ce mémoire et intitulé : « Regulation of pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocin-diabetic rats ».

2. MANUSCRIT

Regulation of pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocin-diabetic rats

Julie Strecko, Christelle Veyrat-Durebex, Sabrina Hoa, Katherine Farrajota, Chantale Boisvert 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

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



Running title: Regulation of GHRH receptor in the diabetic rat

Key words: GHRH receptor, Diabetes, Anterior pituitary, Henle's loop, Northern blotting, Ribonuclease protection assay, Cross-linking, Fluorescence imaging

Titre de l'article: Regulation of pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocin-diabetic rats

Auteurs: Strecko J, Veyrat-Durebex C, Hoa S, Farrajota K, Boisvert C et 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 Julie Strecko. L'induction du diabète et le suivi des colonies de rats diabétiques ont été réalisées par Julie Strecko. Sabrina Hoa, stagiaire d'été de niveau collégial, a collaboré au suivi de la seconde colonie. L'isolation des cellules de l'anse de Henle ainsi que les études de réticulation chimiques ont été réalisées par Julie Strecko avec la collaboration de Sabrina Hoa. Les études de buvardage Northern ont été réalisées par Julie Strecko. Les études de protection à la RNase ont été réalisées par Julie Strecko avec l'aide de Chantale Boisvert, étudiante au doctorat. Les études d'internalisations du GHRH-R ont été réalisées par Christelle Veyrat-Durebex, étudiante post-doctorale 1999-2003, en collaboration avec Julie Strecko et Katherine Farrajota, stagiaire d'été de niveau baccalauréat. Christelle Veyrat-Durebex a participé à la rédaction du manuscrit. Pierrette Gaudreau a supervisé les étapes de réalisation de l'étude et de rédaction de l'article.

le 22 novembre 2004

ACCORD DES COAUTEURS

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

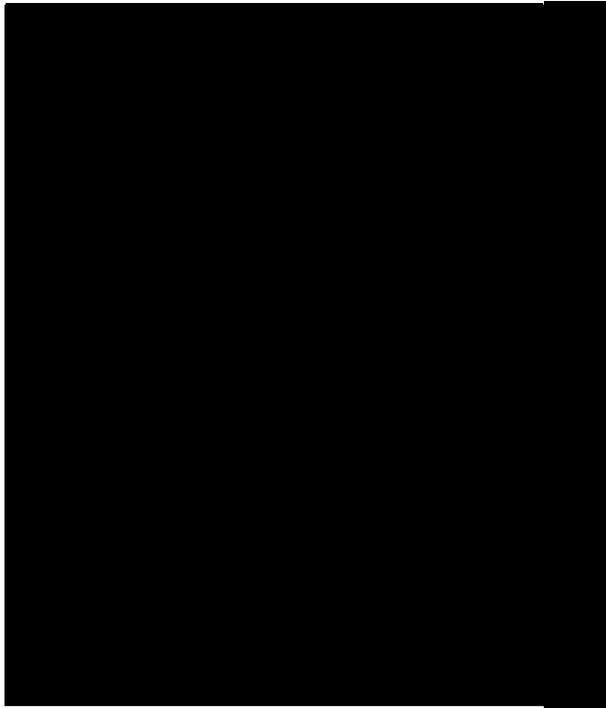
Julie Strecko
Sciences Biomédicales

2. Description de l'article

Strecko J, Veyrat-Durebex C, Hoa S, Farrajota K, Boisvert C et Gaudreau P. Regulation of pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocin-diabetic rats. Soumis à J Cell Physiology, Mars 2005.

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

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'accorde mon consentement à **Julie Strecko** afin qu'elle inclue cet article dans son mémoire de maîtrise intitulé « Impact du diabétique de type I sur le récepteur hypophysaire et rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat »



le 22 novembre 2004

ABSTRACT

In streptozotocin (STZ)-diabetic rats, the pituitary and renal GH/IGF-I systems are affected. As no data exist on the regulation of GHRH receptor (GHRH-R) in this pathological condition, the present study aimed to quantify GHRH-R mRNA and protein levels in the anterior pituitary and renal medulla of control and type-I diabetic rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration. The direct effect of glucotoxicity was also examined in rat anterior pituitary and human (h) GHRH-R-transfected BHK cells, using the fluorescent agonist, [N^α-5-carboxyfluoresceinyl-D-Ala², Ala⁸, Ala¹⁵, Lys²²]hGHRH(1-29)NH₂ (Fluo-GHRH). In the anterior pituitary of diabetic rats 2 days post-STZ administration, the 2.5-kb transcript coding for the functional receptor was increased. Twenty-one days post-STZ, both the 2.5- and 4-kb transcripts were significantly elevated. This was accompanied by an increase of the 72-kDa ¹²⁵I-GHRH-GHRH-R complex. Sixty days post-STZ, the 4-kb transcript remained up-regulated, and a decrease of the 45-kDa ¹²⁵I-GHRH-GHRH-R complex was seen. In the renal medulla of diabetic rats, a decline of GHRH-R mRNA levels was observed 2 days post-STZ administration but levels subsequently returned to 71-77% of normal values. This was accompanied, 2 days post-STZ, by an increase of the 68-kDa ¹²⁵I-GHRH-GHRH-R complex, and at 21 days post-STZ, by an elevation of the 53-kDa complex. In addition, anterior pituitary cultured cells stressed with 12 or 33 mM D- but not L-glucose and hGHRH-R-transfected BHK cultured cells stressed with 33 mM D- but not L-glucose showed marginal internalization of Fluo-GHRH. Altogether, these results suggest that mild to severe cellular glucotoxicity induces tissue-specific dysregulation of the GHRH-R.

INTRODUCTION

In somatotroph cells, the binding of hypothalamic growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) to its specific G-protein-coupled plasma membrane receptor (GPCR) (Seifert et al., 1985; Lau et al., 1991; Abribat et al., 1990; Mayo, 1992) stimulates the production of intracellular cAMP (Bilezikjian and Vale, 1985), leading to GH secretion (Tannenbaum and Ling, 1984; Barinaga et al., 1985) and synthesis (Barinaga et al., 1985) as well as somatotroph proliferation and differentiation (Billestrup et al., 1986; Godfrey et al., 1993; Lin et al., 1993; Mayo et al., 1988). In addition to protein kinase A (PKA) (Wong et al., 1995; Chen et al., 2001), PKC (Chen et al., 2001) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Zeitler P et al., 2000; Pombo et al. 2000) pathways are activated by GHRH.

The GHRH receptor (GHRH-R) has been cloned in the anterior pituitary of several mammalian species (Mayo, 1992; Lin et al., 1992; Hsiung et al., 1993; Horikawa et al., 2001), including the human normal pituitary (Mayo, 1992; Tang et al., 1995) and pituitary adenomas (Tang et al., 1995; Hashimoto et al., 1995; Gaylinn et al., 1993). It belongs to the subfamily B-III of GPCR, which also includes receptors for VIP, secretin, glucagon, GIP, PTH, calcitonin, CRF and PACAP (Mayo, 1992). In rat and mouse pituitaries, the presence of ≈ 2.5 -kb and ≈ 4 -kb GHRH-R mRNA transcripts has been reported (Mayo, 1992; Lin et al., 1992). While the short transcript has been shown to generate the 423-amino-acid (aa) functional GHRH-R (Mayo, 1992; Miller et al., 1999), the complete structure of the 4-kb transcript remains to be elucidated. Correlative evidence has revealed that the ratio of 4/2.5-kb transcript modulates the apparent concentration of high and low affinity GHRH binding sites (Girard et al, 1999). GHRH-R variants, with either a longer third intracytoplasmic loop than that of the 423-aa receptor (Mayo, 1992) or a modified C-terminus (Zeitler et al., 1998), have been identified in the rat pituitary. They may exhibit different abilities to mediate GHRH-induced cAMP production (Miller et al., 1999; Zeitler et al., 1998). In the rat pituitary, chemical cross-linking with 125 I-GHRH(1-44) allowed to identify the presence of specific 27- and 42-kDa (Guarcello et al., 1991) or 28-, 47- and 65-kDa labeled entities. The

47-kDa entity corresponds to a functional GHRH-R (Mayo, 1992; Boulanger et al., 1999) and the lower and higher molecular weight entities may represent receptor fragments and glycosylated and/or dimeric forms of the functional receptor, respectively (Boulanger et al., 2002).

The presence of GHRH and GHRH-R mRNAs has also been demonstrated by RT-PCR in extrapituitary rat tissues, such as the brain, heart, lung, duodenum, small intestine, spleen, epididymis, skeletal muscle and kidney (Matsubara et al., 1995). However, the renal medulla is the sole tissue to contain a sufficient concentration of GHRH-R mRNA to allow its detection without amplification (Matsubara et al., 1995; Boisvert et al., 2002). The size of medullary GHRH-R mRNA transcripts is similar to that found in the pituitary (Boulanger et al., 2002). Thin limb Henle's loop (HL) cells represent the site of localization of GHRH-R mRNA and its functional receptor (Boisvert et al., 2002). In addition, chemical cross-linking studies have shown that 65-, 55- and 38-kDa ^{125}I -GHRH(1-44) NH_2 -specific complexes are present in the renal medulla (Boulanger et al., 2002). It was proposed that the 55-kDa entity is a functional glycosylated homologue of the 47-kDa pituitary GHRH-R, while lower and higher molecular weight entities would represent receptor fragments and glycosylated and/or dimeric forms of the functional receptor, respectively (Boulanger et al., 2002). This specific localization and regulation during development and aging could suggest roles associated with proliferation, differentiation and/or water/electrolyte transport (Boisvert et al., 2002). However, our preliminary results in purified thin limb cells stimulated or not with GHRH(1-29) NH_2 for 4 h, indicate that GHRH activation of the renal GHRH-R regulates sets of genes involved in cell proliferation, differentiation, specialization and survival (unpublished data).

Pituitary and renal GHRH-R mRNA levels are regulated in a complex manner by physiological (Girard et al., 1999; Boisvert et al., 2002; Korytko et al., 1996) and hormonal status (Girard et al., 1999; Boisvert et al., 2002; Miller and Mayo, 1997; Lam et al., 1996; Tam et al., 1996; Miki et al., 1995; Nogami et al., 2000; Petersenn and Shulte, 2000). Estrogens lower pituitary GHRH-R mRNA

levels (Lam et al., 1996; Petersenn and Shulte, 2000) while thyroid hormones and glucocorticoids elevate them (Miller and Mayo, 1997; Lam et al., 1996; Tam et al., 1996; Miki et al., 1995; Nogami et al., 2000; Petersenn and Shulte, 2000). Moreover, metabolic changes, such as those occurring in chronic pathologies, induce several disturbances of the somatotroph axis. For example, in animal models of diabetes, pulsatile GH secretion and GHRH-induced GH release were reported to be decreased (Tannenbaum, 1981; Tannenbaum et al., 1981; Ndon et al., 1992; Olchovsky et al., 1990). This has been related in part to a marked reduction of hypothalamic preproGHRH mRNA levels from 17 to 60 days post-streptozotocin (STZ) administration (Olchovsky et al., 1996; Busiguina et al. 2000). A time-course study in STZ-diabetic rats has shown that hypothalamic GHRH content rose 2 to 4 days post-STZ administration but returned to normal after 7 days and declined thereafter (Leidy et al., 1995). In this investigation, pituitary GH content and serum GH and IGF-I serum levels of diabetic rats decreased over time (Leidy et al., 1995). Other studies have reported a greater *in vivo* (Diz Chavez et al., 2003) or *in vitro* (Sheppard et al., 1989) sensitivity of STZ-rat to GHRH, to induce GH secretion. These discrepancies could originate from variations in the duration and severity of diabetes. In STZ-diabetic rats, the renal GH/IGF-I axis is also affected. In total kidney extracts from diabetic rats, GH receptor (GH-R) mRNA levels were found to be unchanged (Menon et al., 1994; Bornfeldt K et al., 1989) while IGF-I mRNA levels increased from day 1 to 2, post-STZ administration (Flyvberg et al., 1990), and returned to normal levels or decreased from day 4 (Bornfeldt K et al., 1989; Flyvberg et al., 1990). Other reports showed that medullary GH-R, IGF-I and IGF-I receptor mRNA and protein levels were normal 7 days post-STZ administration (Fervenza et al., 1997), although a transient increase of medullary IGF-I immunoreactivity was seen 7 days post-STZ (Gronbaek et al., 1996). In ascending thick limb cells of diabetic rats, IGF-I immunoreactivity increased 7 days post-STZ, with the appearance of damaged and vacuolated cells (Machuneta-Kubara et al., 1994).

The pituitary and renal GHRH-R could be affected during the evolution of diabetes and play an important role in somatotroph and thin limb HL cell sensitivity

to GHRH. Therefore, the objective of the present study was to use a rat model of experimental type-I diabetes, to quantify GHRH-R mRNA and protein levels in anterior pituitary and renal medulla of young rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration, in order to determine time-course effects. Moreover, to obtain information on the direct effect of hyperglycemia on cells sensitivity to GHRH and receptor functionality, *in vitro* internalization studies were performed in rat anterior pituitary and BHK cells expressing human GHRH-R, using a fluorescent agonist of GHRH (Veyat-Durebex et al., 2004).

MATERIALS AND METHODS

Animal handling and drug administration

Two-month-old male Sprague Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, CA) (body weight (BW): 175-225g) were housed in temperature- (22°C), humidity- (65%) and lighting- (12 h cycles: lights on at 07:00 h) controlled rooms. They had free access to standard rat chow (2018- Teklad global 18% protein rodent diet) and water. Rats were acclimatized to the animal facilities and metabolic cages 3-6 days before diabetes induction. They were either housed individually in metabolic cages for the duration of short-term studies (2 and 21 days), or maintained in metabolic cages for the first 2 weeks of the long-term study (60 days) and 1 day per week subsequently. They were otherwise housed individually in plastic cages. Rats were randomly assigned to either the control or diabetic group. BW, food and water intakes and urine volume were assessed before STZ administration to insure that both groups were identical.

Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of STZ (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, CA), freshly solubilized in 0.5 ml citrate buffer, pH 4.5 (Sigma-Aldrich Canada) (Busiguina et al.2000). Recommended doses of 100 and 65 mg/kg BW, for the short- and long-term studies respectively, were chosen to allow correlation of our results with recent data (Busiguina et al.2000) and because normalization of serum glucose levels is possible in these conditions upon insulin treatment (Busiguina et al.2000). This intraperitoneal dose-range has also been shown to cause no general renal toxicity (Busiguina et al.2000, Evans et al., 1984). Control rats were injected with 0.5 ml of citrate buffer. For short-term studies, BW, food and water intakes and urine volume were recorded every day. For the long-term study, they were assessed every 3 days of the first 2 weeks and once a week thereafter. Urine analysis was performed on 24-h collect using Chemstrip 10 (Roche Diagnostics, Laval, QC, CA). Diabetes was defined by the appearance of glucosuria (≥ 1000 mg/dL) and polyuria (≈ 70 mL/24 h) within 24 or 24-72 h for the short- and long-term studies, respectively.

Tissue handling

Two, 21 or 60 days post-STZ administration, the rats were sacrificed in a block-design fashion, between 08:30-11:30 h, by rapid decapitation. Trunk blood was collected and blood glucose analyzed with a Glucometer Elite (Bayer Diagnostics, Toronto, ON, CA). Kidneys, pituitaries and livers were excised, wet weight of the right kidney was taken, and the anterior pituitary and renal medullas rapidly dissected out. Macroscopic evaluation of anterior pituitaries revealed an important reduction of 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). For Northern blotting and ribonuclease protection assay (RPA), all tissues were immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction (left medulla) (rats described in Table 1). For cross-linking studies (rats described in Table 2), the anterior pituitaries were rapidly rinsed and homogenized in ice-cold 50 mM Tris-acetate buffer, pH 7.4, containing 5 mM MgCl_2 and 5 mM EDTA (1 pituitary/0.5 mL), as previously described (Boulanger et al., 1999; Boulanger et al., 2002). The renal medullas were washed and minced in oxygenated ice-cold *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethane sulfonic acid (HEPES)-Ringer buffer, pH 7.4 (Boisvert et al., 2002). For cell culture, the anterior pituitaries were dissected out, cut in 4 to 6 pieces, and rinsed in 25 mM HEPES collecting buffer (pH 7.4) containing 0.25% bovine serum albumin (BSA), 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 704 μM Na_2HPO_4 , 11 mM glucose and 2,000 UI/mg protein DNase I type IV (Sigma-Aldrich 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 thin limb Henle's loop cells

Each cell dispersion was performed using 2 medullas /10 ml of enzyme solution. Minced medullas were incubated at 37°C in HEPES-Ringer collecting buffer, containing 0.2% collagenase II (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, CA) and 0.2% hyaluronidase (ICN Pharmaceuticals, Montreal, QC, CA) for 75 min, as previously described (Boisvert et al., 2002). After 30 min, 0.001% DNase (Boehringer-Mannheim Canada, Laval, QC, CA) was added to dissociate cell

aggregates. The cell suspension was centrifuged at 28 g for 2 min (4°C) and the pellets resuspended in 3 ml of HEPES-Ringer collecting buffer. This step was repeated, and the 2 supernatants were combined, centrifuged at 150 g for 10 min (4°C) and washed twice in HEPES-Ringer buffer. This pellet was resuspended in 2 ml HEPES-Ringer buffer and used to purify thin limb HL cells by differential centrifugation, using a continuous gradient d'Accudenz (Accurate, Westbury, NY, USA) (28). Thin limb HL cells were recovered in fraction I of the gradient after centrifugation at 1,500 g (16°C, 45 min) and washed twice in HEPES-Ringer buffer (430 X g, 16°C, 10 min). Cell viability, assessed by the trypan blue exclusion method, was $\geq 95\%$.

Northern blot hybridization

Total RNA was isolated from each anterior pituitary using a single step acid guanidium-phenol/chloroform procedure with TRIzol (Invitrogen Canada Inc.). Northern blotting was performed as previously described with minor modifications (Boisvert et al., 2002). Aliquots of 12 μ g total RNA were used. Hybridization was performed in fresh Robbins' solution at 65°C, overnight, in the presence of 10×10^6 cpm [32 P]RPR64 /ml of solution. Membranes were subsequently washed (2 X standard saline citrate (SSC) (1 X SSC: 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate), pH 7.0)/0.1% SDS, 23°C, 2 X 10 min; 1 X SSC/0.1% SDS, 65°C, 1-2x10 min; 0.5 X 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 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 GAPDH, after assessing the stability of GAPDH mRNA compared to 28S rRNA, in this experimental condition, as previously described (Girard et al., 1999). 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, QC, CA). 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 µg of liver total RNA). In addition, linearity was verified in each experiment using 6-18 µg of pituitary total RNA from 2-month-old healthy Sprague Dawley male rats. Results were expressed in percentage of relative densities to those of control groups, using a fixed amount of total RNA.

Ribonuclease protection assay

Total RNA from left renal medullas was also isolated with TRIzol. Medullary GHRH-R mRNA levels were assessed using the RPR64 probe (Mayo, 1992). Synthesis of the antisense riboprobe was performed with the MAXIscript transcription kit (Ambion, Austin, TX) and the RPA, using the RPA II kit (Ambion), as previously described (Boisvert et al., 2002). Twenty µg total RNA were hybridized overnight at 50°C, after denaturation at 95°C for 3 min, in the presence of 1 pM [³²P]GHRH-R and 1 pM [³²P]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. Autoradiography was performed at -80°C using Biomax MS-1 films and an intensifying screen. Medullary GHRH-R and GAPDH mRNA and cRNA external standard levels were quantified by densitometry. The intra-assay coefficient of variation of normalized GHRH-R mRNA levels was ≤ 10% in all experiments. Specificity of the [³²P]RPR64 riboprobe was assessed in each experiment using positive (5 µg pituitary total RNA) and negative (20 µg of liver total RNA) controls. The linearity of protected signals was determined in each experiment, using 10-30 µg of total medulla RNA from 2-month-old healthy rats. Results were expressed in percentage of relative density to those of control group, using a fixed amount of total RNA.

Chemical cross-linking

For cross-linking experiments in rat anterior pituitary homogenates, [¹²⁵I]-Tyr¹⁰]hGHRH(1-44)NH₂ (¹²⁵I-GHRH; 2,000 Ci/mmol, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, CA) binding was carried out at equilibrium (23°C, 60 min) in 50 mM

Tris-acetate (pH 7.4), containing 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 1 mM diprotin, 100 μM leupeptin (Sigma-Aldrich Canada; Boehringer-Mannheim), 0.42% BSA, 175-250 pM ¹²⁵I-GHRH and 250 μl (~375-500 μg protein) of homogenates, in a final volume of 1.5 ml (Boulanger et al., 2002). For those conducted in semi-purified medullary thin limb HL cells, ¹²⁵I-GHRH binding was carried out at equilibrium, in the condition described above, with 250 μl (7.5 x 10⁶ cells; ~250 μg protein), in a final volume of 1.5 ml. The binding assay buffer contained 50 mM Tris-acetate (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 0.42% BSA, 5 mM EDTA, 1 mM diprotin, 100 μM leupeptin, 100 μM bacitracin, 1 mM benzamidin, 0.1 mg/ml trypsin inhibitor, 250 μM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μM bestatin and 0.3 μM aprotinin. This assay condition was validated in our laboratory and represented the optimal condition to maintain an acceptable level of specific binding at 23°C. In both preparations, non-specific binding was determined in the presence of 1 μM rGHRH (1-29)NH₂ (synthesized in our laboratory, (Gaudreau et al., 1992)). Incubations were stopped by centrifugation (12,000g, 5 min, 4°C), and the pellets were resuspended in 25 mM Hepes (pH 8.0) containing 5 mM of the cross-linking agent 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC, Sigma-Aldrich Canada) (Boulanger et al., 1999; Boulanger et al., 2002). Incubation (23°C, 30 min) was stopped with 50 mM glycine (26, 29). The final pellets were solubilized in 75 μl of Laemmli buffer (Laemmli, 1970), boiled for 5 min, subjected to SDS/12% PAGE (Mini-protean II, Bio-Rad, Mississauga, ON) and transferred (Trans-Blot Transfer cell, Bio-Rad) to PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore, Nepean, ON, CA). Precision Plus protein standards (Bio-Rad) were run in each gel. Autoradiograms were generated by exposing PVDF membranes to Biomax MS-1 films at -80°C with an intensifying screen for 3-6 days. Results were expressed in percentage of relative specific densities (specific: total - non-specific binding) to those of control groups, using a fixed amount of protein.

Isolation and culture of anterior pituitary and hGHRH-R-transfected BHK cells for internalization studies

Anterior pituitary fragments were incubated for 120 min at 37°C in buffer (25 mM HEPES) containing 0.4% collagenase type I (240 U/mg) (Invitrogen Canada

Inc), 0.2% dispase (Boehringer-Mannheim) and 10 $\mu\text{g/ml}$ DNase I type IV (Sigma-Aldrich Canada), as previously described (Veyrat-Durebex et al., 2004). After dispersion, the cells were incubated 10 min at 37°C in HEPES buffer, containing 0.02% Na_2EDTA and 0.0008% neuraminidase (Sigma-Aldrich Canada). They were centrifuged (800 g, 4 min, 4°C), washed 3 times in DMEM supplemented with 6 mM of D-glucose, 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen Canada Inc.), 1% penicillin (50 U/ml)/streptomycin (1.25 $\mu\text{g/ml}$) (Invitrogen Canada Inc.) and 0.1% amphotericin (37°C, 95% air-5% CO_2) ($\approx 1 \times 10^6$ cells/ml). The cells were cultured 4 h in the same medium and subsequently 16 h in the medium containing 6, 12 or 33 mM D- or L-glucose. BHK 570 cells, stably expressing the hGHRH-R, were cultured in DMEM supplemented with 25 mM of D-glucose, 10% FBS, 1% penicillin (50 U/ml)/streptomycin (1.25 $\mu\text{g/ml}$) (Invitrogen Canada Inc.) and 2 μM methotrexate (Sigma-Aldrich) (37°C, 95% air-5% CO_2). Confluent cells were subsequently cultured for 48 h (6 and 33 mM D- or L-glucose) or 72 h (6 and 12 mM D- or L-glucose). For internalization experiments, cells were detached by gentle manual scraping and harvested in culture medium. They were centrifuged (800 g, 5 min, 4°C), washed 3 times in cold Tris-acetate buffer, containing 50 mM sucrose and suspended in the same buffer at a concentration of 0.5-0.8 $\times 10^6$ cells/ml. Cell viability, assessed by the Trypan blue exclusion method, was $\geq 91\%$ after harvesting.

Apoptosis/necrosis assessment

For each culture condition, 100 μl of YO-PRO-1 and propidium iodide was added to pellets from 0.3 $\times 10^6$ cell samples/ 300 μl phosphate-buffered saline (PBS) centrifuged (1000g, 3 min, 4°C) to label apoptotic and necrotic cells (Vybrant Apoptosis Assay Kit #4; Molecular Probes, Eugene, OR), respectively. Control incubations were performed with PBS alone. Cells were incubated for 20-30 min at 4°C and cytocentrifuged onto glass slides (32 g, 2 min, room temperature) using a Cytospin 3 centrifuge (Shandon Inc., Pittsburg, PA). The slides were subsequently kept on ice in the dark for immediate fluorescence microscopy examination.

Internalization studies with a fluorescent agonist of hGHRH(1-29)NH₂

In anterior pituitary and hGHRH-R-transfected BHK cells were kept on ice and incubated in Tris-acetate buffer, containing 50 mM sucrose and 10 nM of the fluorescent agonist, [N^α-5-carboxyfluoresceinyl-D-Ala², Ala⁸, Ala¹⁵, Lys²²]hGHRH (1-29)NH₂ (Fluo-GHRH) (Veyrat-Durebex et al., 2004), at 4°C for 40 min. Non-specific binding was determined in the presence of 1 μM of r or hGHRH(1-29)NH₂ (Gaudreau et al., 1992), depending upon the nature of the GHRH-R studied. After centrifugation (2,500 or 4,000g for pituitary and BHK cells, respectively, 4 min, 4°C), the supernatants were removed, and the cells washed once in cold Tris-sucrose buffer. The cells were then either suspended in cold incubation buffer and cytocentrifuged for immediate visualization, or warmed at 37°C for 90 min to allow Fluo-GHRH internalization. Reactions were stopped by placing the assay tubes on ice. The cells were cytocentrifuged onto glass slides and processed as described above. In all experiments, the final volume of incubation with Fluo-GHRH was 200 μl/assay tubes. All phases of the internalization protocol were performed at 4°C to prevent receptor internalization (Veyrat-Durebex et al., 2004) unless otherwise stated (incubation at 37°C).

Data analysis

Quantification of GHRH-R mRNA transcripts, protected fragments and ¹²⁵I-GHRH-GHRH-R complexes was performed using an IS1000 Digital imaging system (Alpha Innotech Corp/Canberra Packard, Qc, CA). The validity of comparing GHRH-R mRNA levels, using RPA and Northern blotting, has been assessed using total RNA from 2-month-old rats. GHRH-R mRNA levels obtained from Northern blots (sum of densities of the 2 transcripts) were not significantly different from those obtained by RPA (sum of densities of the 2 protected fragments), indicating that pituitary and medullary GHRH-R mRNA levels can be compared.

Fluorescence imaging was performed using a Nikon Eclipse TE600 microscope (X20 objective) equipped with a coolsnap camera, a Nikon super high-pressure mercury lamp, and filters for excitation/emission of fluorescein (485/520

nm) (Nikon Canada Inc., Montreal, QC, CA). Fluorescence microscopy image acquisition was performed on 50-60 individual cells from 3-6 independent experiments in duplicate, for each condition. Data were analyzed with the MetaMorph 4.6 software (Universal Imaging Corporation, Canberra Packard Canada, Ltd., Mississauga, ON, CA). Fluorescence intensities and total fluorescence were quantified using the pseudo-color/segmented histogram function, as previously described (Veyrat-Durebex et al., 2004).

Results were expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between data from control and diabetic rats were performed using the unpaired Student's *t* test. The effects of incubation conditions on GHRH fluorescence intensity and distribution, as well as apoptosis and necrosis levels were analyzed by ANOVA, followed by Dunnett's multiple range test.

RESULTS

Characteristics of diabetic rats

As shown in Tables 1 and 2, BW loss, hyperglycemia (>400 mg/dL), hyperglucosuria (>2000 mg/dL) and polyuria characterized short- and long-term diabetic status of both rat colonies. 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). At sacrifice, the BW from diabetics rats was decreased 1.1 to 1.2 ($P<0.01$ to $P<0.001$), 1.4 to 1.5 ($P<0.001$) and 1.4 to 1.7 times ($P<0.001$), 2, 21 and 60 days post-STZ, respectively, when compared to that of age-matched controls. Right kidney wet weights per 100 g/BW were 1.2, 1.5 to 1.8 and 1.7 times higher ($P<0.001$) in diabetic rats, 2 days, 21 days and 60 days post-STZ, respectively, compared to age-matched controls. Food intake per 24 h was unchanged 2 days post-STZ but increased 1.6 to 1.8 times ($P<0.001$), 21 and 60 days post-diabetes induction. Water intake and urine volume per 24 h increased 3 to 6 times ($P<0.001$) and 7 to 20 ($P<0.001$) times, respectively, 2 to 60 days post-STZ.

[Position of Tables 1 and 2]

Levels of anterior pituitary GHRH-R mRNA transcripts

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 was detected in the gland of control and diabetic rats, 2, 21 and 60 days post-STZ, as previously reported in healthy young rats (Mayo, 1992; Girard et al., 1999). Levels of GHRH-R mRNA transcripts showed several changes according to the length and severity of diabetes (Fig. 1). When expressed per 12 μ g total RNA, the level of the 2.5 kb GHRH-R mRNA transcript increased 1.4 and 1.5 times ($P<0.05$) 2 (Figs. 1 A and B), and 21 (Figs. 1 A and C) days post-STZ, respectively, in comparison to that of age-matched controls. No significant change was observed 60 days post-STZ (Figs. 1 A and D), indicating a decrease in comparison to shorter periods of diabetes. A significant increase of the 4-kb transcript was seen 21 and 60 days

post-STZ (2.8 ($P<0.001$) and 1.7 times ($P<0.05$), respectively) when compared to that of age-matched controls (Fig. 1). Combined levels of 2.5- and 4-kb transcripts increased 1.5 and 1.8 times ($P<0.01$), 2 and 21 days post-STZ and returned to normal 60 days post diabetes induction ($P<0.01$). Finally, the 4 kb/ 2.5 kb ratio of transcripts was not modified 2 days post-STZ, but increased 2.2 ($P<0.001$) and 1.7 times ($P<0.05$), 21 and 60 days post-STZ, respectively. Anterior pituitary total RNA content did not change 2 days post-STZ, but decreased 2.3 to 2.5 times ($P<0.001$), 21 and 60 days post-diabetes (data not shown).

[Position of composite Figure 1]

Levels of renal medulla GHRH-R mRNA protected fragments

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 the total density of GHRH-R mRNA. When expressed per 20 μg total RNA, the level of GHRH-R mRNA protected signals was 2.2 ($P<0.001$), 1.3 ($P<0.05$) and 1.4 ($P<0.01$) times lower in the medulla of diabetic rats 2, 21 and 60 (Figs. 2A and B) days post-STZ administration, respectively, in comparison to aged-matched controls. Medullary total RNA content increased 1.2 times ($P<0.05$) and decreased 1.5 times ($P<0.01$) 2 and 21 days post-STZ, respectively and returned to normal 60 days post-STZ (data not shown).

[Position of composite Figure 2]

Levels of anterior pituitary ^{125}I -GHRH-GHRH-R complexes

In anterior pituitary homogenates, ^{125}I -GHRH-GHRH-R levels were assessed by cross-linking. Specific binding, determined with 1 μM rGHRH(1-29) NH_2 , represented 60-75% of the total binding. The presence of 72-, 45- and 24-kDa ^{125}I -GHRH-labeled complexes was observed in the gland of both control and diabetic rats. However, the levels of complexes showed a number of changes during the evolution of diabetes (Figs. 3A-3D). That of the 72-kDa complex

increased 2.6 times ($P<0.05$), 21 days post-STZ (Fig. 3) but did not reach significance 60 days post-STZ (Figs. 3A and D; 1.6 times), when compared to that of age-matched controls. A decrease of the 45-kDa complex was observed 60 days post-STZ (Figs. 3A and D; 2.2 times, $P<0.05$). The 24-kDa complex remained unchanged 2, 21 and 60 days post-STZ.

[Position of composite Figure 3]

Levels of medullary thin limb Henle's loop cells ^{125}I -GHRH-GHRH-R complexes

In semi-purified medullary thin limb HL cells, ^{125}I -GHRH-GHRH-R levels were also assessed by chemical cross-linking. Specific binding, determined in the presence of 1 μM rGHRH(1-29) NH_2 , represented 55-65% of total signals. The presence of 68-, 53-, 41- and 35- kDa ^{125}I -GHRH-labeled complexes was detected in thin limb HL cells of control and diabetic rats, 2, 21 and 60 days post-STZ. The level of the 68-kDa complex increased 1.6 times ($P<0.05$) 2 days post-STZ (Figs. 4A and 4B), decreased 2.0 times ($P<0.05$) 21 days post-STZ (Figs. 4A and 4C) and returned to control levels 60 days post-STZ (Figs. 4A and 4D). The 53-kDa entity did not reach a significant increase (4.2 times, $P>0.05$) 2 days post-STZ but increased 2 times ($P<0.01$) 21 days post-STZ. The level of the 41-kDa complex increased 2 days post-STZ (2.2 times, $P<0.05$) and returned to normal 21 and 60 days post-STZ. The intensity of the 35-kDa complex did not change significantly in the course of diabetes.

[Position of composite Figure 4]

In vitro effects of glucose on the internalization of Fluo-GHRH in rat anterior pituitary and BHK cells expressing hGHRH-R

The level of apoptotic/necrotic pituitary cells remained $\leq 15\%/18\%$ when cultured in the presence of increasing concentrations of D- or L-glucose (6, 12, 33 mM) for 16 h. That of GHRH-R-transfected BHK cells remained $\leq 15\%/11\%$ or $\leq 11\%/12\%$ when cultured in the presence of increasing concentrations of D- or L-glucose (6, 12, 33 mM) for 48 or 72 h, respectively. No significant difference in

apoptosis and necrosis levels was observed in the 2 cell types between the different glucose conditions studied. The removal of Fluo-GHRH at 4°C was maximal with 1 μ M h or rGHRH(1-29)NH₂. After a 40-min incubation at 4°C, very low to moderate levels of fluorescence were widely distributed on the cell surface. As previously reported, Fluo-GHRH internalization was temperature-dependent (Veyrat-Durebex et al., 2004). When pituitary or BHK cells were warmed at 37°C for 90 min, a punctate pattern of fluorescence appeared with moderate to very high levels of fluorescence, due to internalization and concentration of Fluo-GHRH in organelles. In pituitary cells, this change was correlated with significant increase of fluorescence (Fig. 5A-E, F, H), except for 12 (Fig. 5B, left panel) and 33 mM D-glucose (Fig. 5A-G and 5B, right panel). Interestingly, in cells cultured in the presence of these concentrations of D-glucose, the level of total fluorescence was 1.3 and 1.6 times lower than that in 12 or 33 mM L-glucose ($P < 0.05$) but not significantly different from that observed at 4°C (Fig. 5B). In hGHRH-R-transfected BHK cells, no deleterious effect was seen with 12 mM D-glucose (Fig. 5C, left panel), but a 3.0-fold decrease of fluorescence was observed when the cells were exposed to 33 mM D-glucose in comparison to that of L-glucose ($P < 0.05$) (Fig. 5A-C versus 5A-A). This level of fluorescence was not different from that observed at 4°C (Fig. 5C, right panel).

[Position of Figure 5]

DISCUSSION

In type-I diabetic rat models, several perturbations of the anterior pituitary GHRH/GH/IGF-I and renal GH/IGF-I axes have been reported. However, studies directly addressing the impact of duration and severity of diabetes and hyperglycemia, on the regulation of GHRH-R, are lacking. In the pituitary, the GHRH-GHRH-R system exerts an important role in stimulating GH secretion and synthesis as well as in somatotroph proliferation and differentiation. In the kidney, more specifically in thin limb HL cells, activation of the GHRH-R could participate to cell proliferation, differentiation, specialization and survival (unpublished observation).

In the pituitary of diabetic rats, both GHRH-R mRNA transcripts were submitted to a time-dependant regulation. Two days post-STZ administration, a time at which no change has occurred in daily food intake and anterior pituitary total RNA content of diabetic rats, the 2.5-kb transcript, coding for the functional receptor, was increased while the level of the functional GHRH-R (45-kDa complex) and that of other ^{125}I -GHRH-GHRH-R complexes was unchanged. Since the GHRH hypothalamic content was shown to increase 1.4 times only during the early stage of diabetes (day 2 to 4 post-STZ; Leidy et al., 1995), it might be proposed that the 2.5-kb transcript is up-regulated by an increased GHRH tone. Alternatively, an increased GHRH content may result from an accumulation of the peptide in hypothalamic neurons and lead to a reduced GHRH secretion. Nevertheless, such changes in hypothalamic GHRH appears to be insufficient to induce *in vivo* changes at the GHRH-R protein level. Twenty-one days post-STZ, both transcripts were significantly increased as well as the 4/2.5-kb ratio, underlying an important elevation of the 4-kb transcript. This was accompanied by an increase of the 72-kDa ^{125}I -GHRH-GHRH-R complex. The absence of change in the level of the 45-kDa complex could be related to an immediate glycosylation and/or dimerization to form the 72-kDa entity, induced by the hyperglycemic environment. At 60 days post-STZ, only the 4-kb transcript remained up-regulated, leading to an increase of the 4/2.5-kb ratio and a decrease of the functional GHRH-

R (45-kDa complex) and its putative degradation product (24-kDa complex). As glycosylation and/or dimerization of the 45-kDa complex likely continue to occur 60 days post-STZ, it may result to its decrease since the 2.5-kb GHRH-R mRNA level is not elevated. Although the identity of the 4-kb transcript is currently unknown, evidence suggests that it could either be an alternative splicing product, generating a GHRH-R isoform, as described in the human pituitary (Tang et al., 1995; Hashimoto et al., 1995) or a GHRH-R mRNA transcript bound to an adaptor protein, preventing optimal translation (Zimber et al., 2004). Altogether, the regulation of anterior pituitary GHRH-R mRNA transcripts and proteins offers for the first time an explanation that may reconcile the divergent results reported in the literature on GHRH-induced GH secretion, using a large variety of diabetic rat models (from 7- to 60-day post STZ administration).

In the renal medulla of diabetic and control rats, a single pattern of GHRH-R mRNA protected fragments was identified, as previously reported (Boisvert et al. 2002). Interestingly, diabetes regulated GHRH-R mRNA levels differently from those in the pituitary. They were drastically decreased 2 days post-STZ administration, but subsequently returned to 71-77% of their normal value, suggesting that the GHRH involved in this regulation, is probably of medullary origin (Matsubara et al., 1995). Changes in GHRH-R mRNA levels of thin limb HL cells were accompanied 2 days post-STZ by an increase of the 68-kDa ¹²⁵I-GHRH-GHRH-R (putative glycosylated and/or dimeric form of GHRH-R (Boulanger et al., 2002), a trend to an increase of the 53-kDa complex (putative functional glycosylated GHRH-R (Boulanger et al., 2002)) and an increase of a weakly labeled 44-kDa complex (degraded GHRH-R). At 21 days post STZ, the 53-kDa complex increased, while no effect was observable 60 days post-STZ. Altogether, the present results suggest a predominant effect of diabetes on the renal GHRH-R in the early phases of the disease. Whether or not an increased translation of the GHRH-R may be related to epithelial thin limb cell protection from hyperglycemia will have to be explored.

Apart from hypothalamic GHRH, changes in serum nuclear hormones could influence GHRH-R mRNA levels. In STZ-diabetic rats, circulating levels of glucocorticoids are increased (Chan et al., 2001) while those of thyroid hormones are decreased (Ortiz-Caro et al., 1984). Both of them are required for optimal expression of GHRH-R in the pituitary (Miller and Mayo, 1997; Lam et al., 1996; Tam et al., 1996; Miki et al., 1995; Nogami et al., 2000; Petersenn and Shulte, 2000) and likely in the renal medulla. However, the dynamic of changes in serum hormonal levels and their tissue-specific receptors will have to be assessed, to establish a causal role in the dysregulation of pituitary and renal GHRH-R. Alternatively, hyperglycemic status itself could directly regulate GHRH-R mRNA levels. A recent study undertaken in primary cultured rabbit proximal tubule cells has shown that high glucose (25 mM) down-regulates angiotensin type 1 receptor mRNA and protein levels, via a PKC-oxidative stress-transforming growth factor- β 1 signal cascade (Park et al., 2002).

To study more directly the role of glucotoxicity on the functionality of GHRH-R, anterior pituitary and hGHRH-R-transfected BHK cultured cells were exposed to increasing concentrations of D- or L-glucose for periods of time not affecting differentially cellular integrity. In pituitary cells stressed with 12 or 33 mM D-glucose, marginal internalization of Fluo-GHRH was observed. In transfected-BHK cells, Fluo-GHRH-mediated activation and internalization of GHRH-R was blunted when exposed to 33 mM D-glucose. These results suggest that a mild to severe cellular glucotoxicity is sufficient to induce detrimental effects to the GHRH-R itself (reduced binding affinity and/or GHRH-R concentration) and/or to the cellular machinery associated with its internalization process. These results indicate that sustained hyperglycemia exerts a direct effect on GHRH-R functionality and participate to the *in vivo* dysregulation of the GHRH-R in diabetic rats, leading to a loss of sensitivity to GHRH. The various molecular and cellular mechanisms by which glucotoxicity affects the GHRH-R will deserve further 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 Andersen (Novo Nordisk, Måløv, Denmark) for the gift of hGHRH-R-transfected BHK cells.

This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research. J Strecko (JS) and C Boisvert were 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*. S Hoa was recipient of a summer studentship from *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal* Research Center and Department of Medicine, University of Montreal. C Veyrat-Durebex was recipient of a postdoctoral fellowship from FRSQ. P Gaudreau is recipient of a scholarship *chercheur-boursier national* from FRSQ.

REFERENCES

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.

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.

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.

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.

Boisvert C, Paré C, Veyrat-Durebex C, Robert A, Dubuisson S, Morel G and Gaudreau P 2002 Localization and regulation of a functional growth hormone-releasing hormone receptor in the rat renal medulla. *Endocrinology* 143: 1475-1484.

Bornfeldt KE, Arnqvist HJ, Enberg B, Mathews LS, Norstedt 1989 Regulation of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor gene expression by diabetes and nutritional state in rat tissues. *J Endocrinol* 122: 651-656.

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.

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.

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.

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.

Chaves YD, Calvar CS, Tilve DP, Ferrer FM 2003 GH responses to GHRH and GHRP-6 in Streptozotocin (STZ)-diabetic rats. *Life Sciences* 73: 3375-3385.

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* 78: 356-368.

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.

Fervenza FC, Tsao T, Hoffman AR, Rabkin R 1997 Regional changes in the intra renal insulin-like growth factor-1 axis in diabetes. *Kidney Int* 51: 811-818.

Flyvbjerg A, Bomfeldt 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.

Gaudreau P, Boulanger L, Aribat 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.

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.

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.

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.

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.

Guarcello V, Weigent DA, Blalock JE. 1991 Growth hormone-releasing hormone receptors on thymocytes, and splenocytes from rats. *Cell Immunol* 136: 291-302.

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.

Horikawa R, Gaylinn BD, Lyons CE, Thorer MO 2001 Molecular cloning of ovine and bovine growth hormone-releasing hormone receptors: the ovine receptor is C-terminally truncated. *Endocrinology* 142: 2660-2668.

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.

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.

Laemmli UK 1970 Cleavage structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

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.

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.

Leidy JW, Cugini CD, Driscoll HK Jr, 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.

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.

Lin SC, Lin CR, Gukovsky I, Lusic AJ, Sawchenko PE, Rosenfield MG 1993 Molecular basis of the little mouse phenotype and implication for cell type-specific growth. *Nature* 364: 208-213.

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.

Mayo KE 1992 Molecular cloning and expression of a pituitary specific receptor for growth hormone-releasing factor. *Mol Endocrinol* 6: 1734-1744.

Mayo KE, Hammer RE, Swanson LW, Brinster RL, Rosenfield MG, Evans RM 1988 Dramatic pituitary hyperplasia in transgenic mice expressing a human growth hormone-releasing factor gene. *Mol Endocrinol* 2: 606-612.

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.

Miki N, Ono M, Murata Y, 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 Comm* 217: 1087-1093.

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.

Miller TL, Mayo KE 1997 Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 138: 2458-2465.

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.

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.

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.

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.

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. *Endocrinology* 126: 53-61.

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.

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.

Petersenn S, Schulte HM 2000 Structure and function of the growth-hormone-releasing hormone receptor. *Vitam Horm* 59: 35-69.

Pombo CM, Zalvide J, Gaylinn BD, Dieguez C 2000 Growth hormone-releasing hormone stimulates mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 141: 2113-2119.

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. *Eur J Endocrinol* 133: 110-116.

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.

Sheppard MS, Eatock BA, Bala RM 1989 Altered release of growth hormone from dispersed adenohypophysial cells of streptozotocin diabetic rats. I. Effects growth-hormone releasing factor and somatostatin. *Can J Physiol Pharmacol.* 7: 1315-13-20.

Tam SP, Lam KSL, Srivastava G 1996 Gene expression of hypothalamic somatostatin, growth hormone releasing factor, and their pituitary receptors in hypothyroidism. *Endocrinology* 137: 418-424.

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.

Tannenbaum GS 1981 Growth hormone secretory dynamics in streptozotocin diabetes: evidence of a role for endogenous circulating somatostatin. *Endocrinology* 108: 76-82.

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.

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.

Veyrat-Durebex C, Pomerleau L, Langlois D, and Gaudreau P 2004 Internalization and trafficking of the human and rat growth hormone-releasing hormone receptor. *J Cell Physiol*, DOI 10.1002/jcp.20233, published Online: 21 Oct 2004.

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.

Zeitler P, Siriwardana G 2000 Stimulation of mitogenic-activated protein kinase pathway in rat somatotrophs by growth hormone-releasing hormone. *Endocrine* 12: 257-264.

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.

Zimber A, Nguyen Q-D, Gespach C 2004 Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease. *Cell Signal* 16: 1085-1104.

TABLE 1. Body weight, kidney wet weight, food and water intakes and biochemical parameters of short- (2 and 21 days) and long-term (60 days) STZ-diabetic rats used for the GHRH-R mRNA study.

		2 days post-injection		21 days post-injection		60 days post-injection	
		Control	Diabetic	Control	Diabetic	Control	Diabetic
BW (g)	Day 0	324±5	331±3	298±8	302±6	232±3	234±3
	Sacrifice	338±3 ^a	302±4 ^{b,c}	397±12 ^e	267±12 ^{c,f}	525±19 ^e	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	28±2	30±1	34±3	23±1	23±1
	Sacrifice	31±3	27±5	28±1	44±3 ^{c,f}	32±1 ^e	59±5 ^{b,c}
Water intake (g)	Day 0	33±2	39±2	35±1	34±2	40±2	39±2
	Sacrifice	33±1	127±10 ^{b,c}	39±2	224±16 ^{b,c}	49±2 ^g	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	14±1	14±1	13±1	14±1	12±2
	Sacrifice	9±1	82±8 ^{b,c}	16±2	>250 ^{b,c}	ND	>250 ^b

Day 0 = streptozotocin injection. ND = not determined. Values represent the mean ± SEM of 7 to 9 rats per group.

^a $P < 0.05$ when compared with controls at day 0; ^b $P < 0.01$ 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

TABLE 2. Body weight, kidney wet weight, food and water intakes and biochemical parameters of short- (2 and 21 days) and long-term (60 days) STZ diabetic-rats used for the ^{125}I -GHRH cross-linking study.

		2 days post-injection		21 days post-injection		60 days post-injection	
		Control	Diabetic	Control	Diabetic	Control	Diabetic
BW (g)	Day 0	248±3	245±3	257±4	260±4	252±4	250±4
	Sacrifice	259±12	221±3 ^{a, b}	391±7 ^d	275±9 ^c	524±14 ^d	380±17 ^{a, c}
Right kidney wet weight (g)	Sacrifice	0.97±0.02	0.98±0.03	1.28±0.02	1.37±0.05	1.48±0.05	1.75±0.10 ^e
Right kidney wet weight/100g BW (g)	Sacrifice	0.37±0.01	0.44±0.01 ^c	0.33±0.01	0.50±0.06 ^b	0.28±0.01	0.48±0.02 ^c
Food intake (g/24h)	Day 0	26±1	26±1	26±1	27±1	27±1	26±1
	Sacrifice	27±1	26±2	28±1	44±2 ^{a, c}	26±1	47±3 ^{a, c}
Water intake (g)	Day 0	26±2	25±3	32±2	31±1	26±2	24±2
	Sacrifice	31±2	88±8 ^{a, c}	31±1	163±9 ^{a, c}	26±2	167±24 ^{a, c}
Blood glucose (mg/dL)	Sacrifice	105±3	>400 ^c	108±4	>500 ^c	93.5±2.4	>400 ^c
Glucosuria (mg/dL)	Sacrifice	<60	>2000 ^c	<60	>2000 ^c	<60	>2000 ^c
Urine volume (mL/24h)	Day 0	9±1	8±1	7±1	8±1	9±1	7±1
	Day 8 Sacrifice	10±1	74±6 ^{a, c}	11±2	>70 ^{a, c}	11±2	>100 ^{a, c}
				ND	ND	ND	ND

Day 0 = streptozotocin injection. ND = not determined. Values represent the mean ± SEM of 9 to 15 rats per group.

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

Figure 1

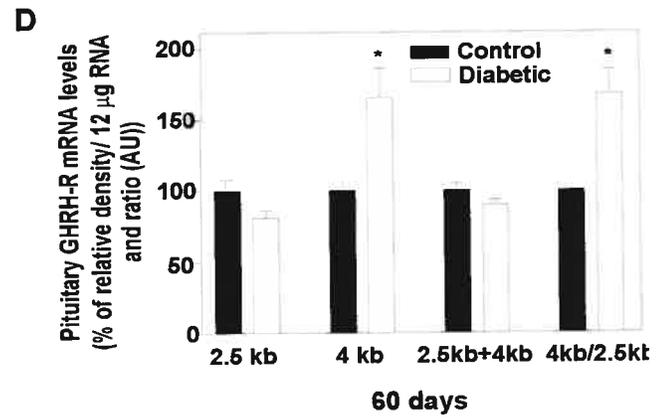
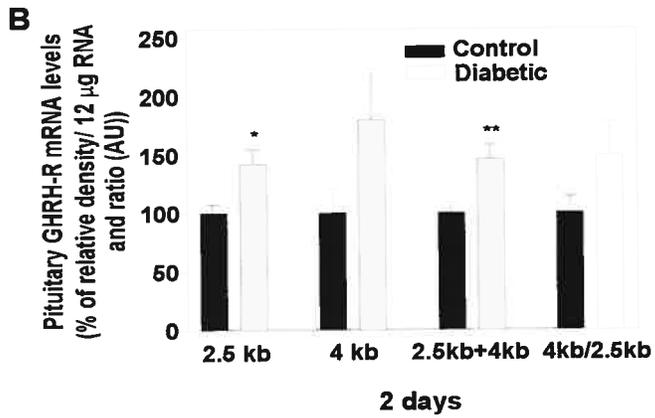
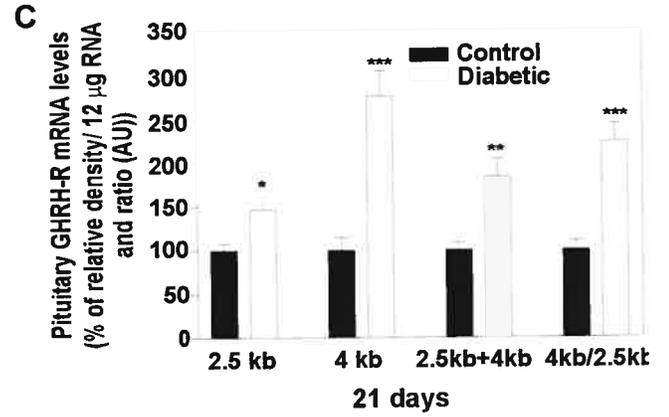
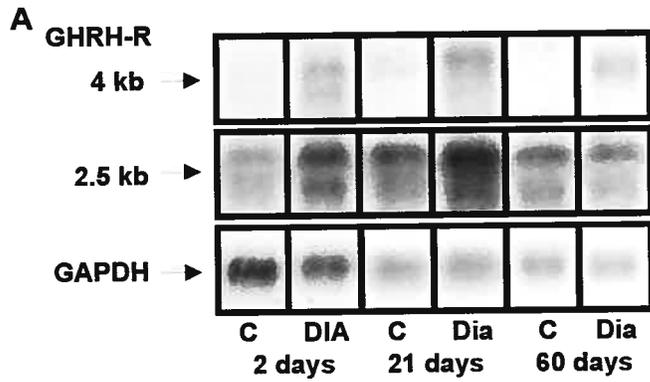
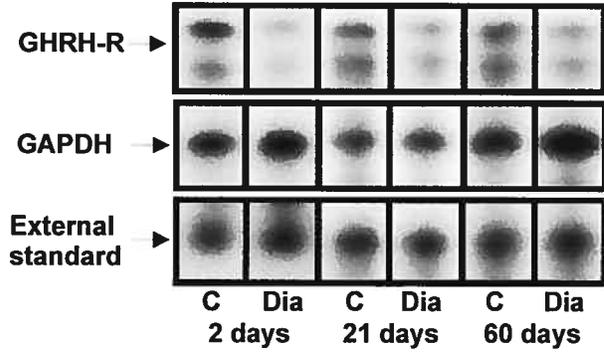


Fig. 1 Regulation of GHRH-R mRNA transcripts in the anterior pituitary of control (C) and diabetic (Dia) rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration. Twelve μg of total RNA was analyzed by Northern blotting from each rat. A) Autoradiographic representation of GHRH-R mRNA transcripts and GAPDH from one control and diabetic rat, 2, 21 and 60 days post-STZ administration. B), C) and D) GHRH-R mRNA levels expressed per 12 μg total RNA in percentage of relative density to that obtained in pituitaries from control groups. Results represent the mean \pm SEM of one experiment performed in singulate, using 8 rats per group (C and Dia). GHRH-R mRNA levels were normalized in each lane with GAPDH. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the pituitary from controls (Student's t test).

Figure 2

A



B

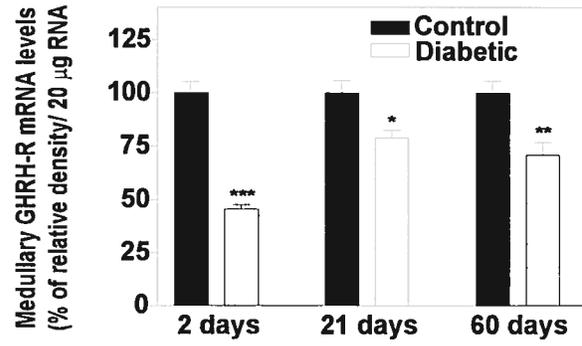


Fig. 2 Regulation of GHRH-R mRNA protected fragments in the renal medulla of control (C) and diabetic (Dia) rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration. Twenty μg of total RNA was analyzed by RPA for each group. A) Autoradiographic representation of GHRH-R mRNA, GAPDH and RPR-64 Msc I RNA standard (40 pg) signals from one control and diabetic rat, 2, 21 and 60 days post-STZ administration. B) GHRH-R mRNA levels expressed per 20 μg total RNA in percentage of relative density to that obtained in medullas from control groups. Results represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in triplicate, using 8-9 rats per group (C and Dia). Amounts of GHRH-R mRNA were normalized in each lane with GAPDH and RPR-64 Msc I. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ when compared with GHRH-R mRNA levels in the medulla from controls (Student's t test).

Figure 3

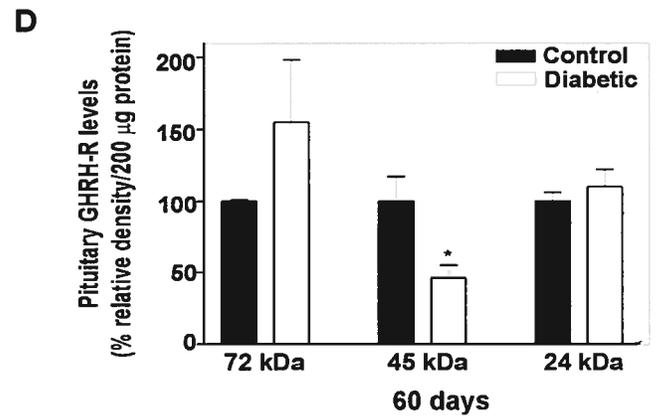
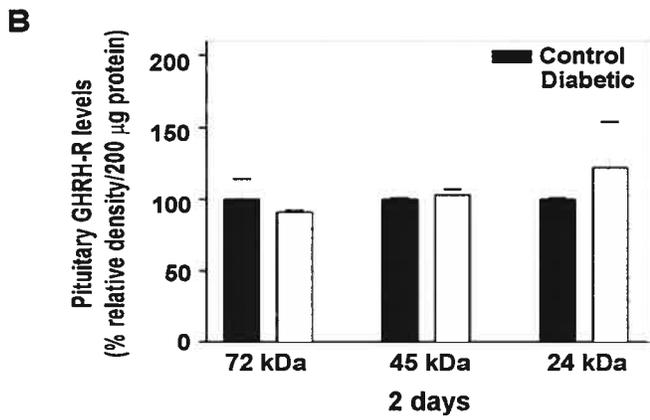
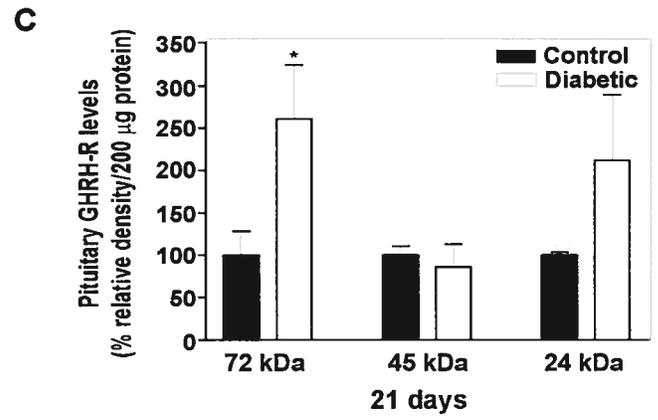
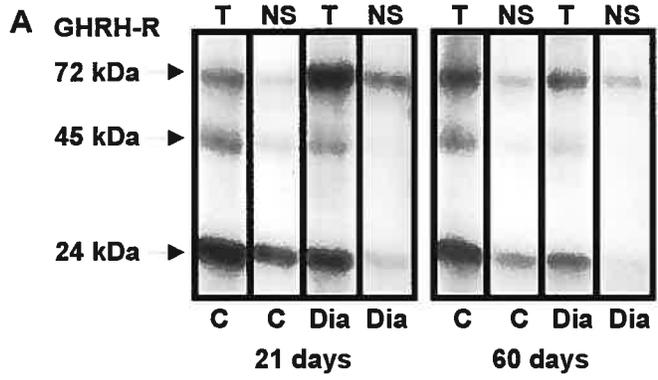


Fig. 3 Regulation of anterior pituitary ^{125}I -GHRH-GHRH-R levels of control (C) and diabetic (Dia) rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration. Three hundred and seventy five to 500 μg protein were analyzed following cross-linking with 5 mM EDAC and SDS-PAGE. A) Autoradiographic representation of ^{125}I -GHRH-labeled complexes from one control and diabetic rat, 21 and 60 days post-STZ administration. Lane T represents total binding and lane NS, non-specific binding in the presence of 1 μM rGHRH(1-29) NH_2 . B), C) and D) Densities of ^{125}I -GHRH-labeled complexes expressed per 200 μg total protein in percentage of relative density to that obtained in pituitaries from control groups. Results represent the mean \pm SEM of 2-3 independent experiments performed in duplicate, using 2-3 rats per group. * $P < 0.05$ when compared with GHRH-R levels in the pituitary from controls (Student's t test).

Figure 4

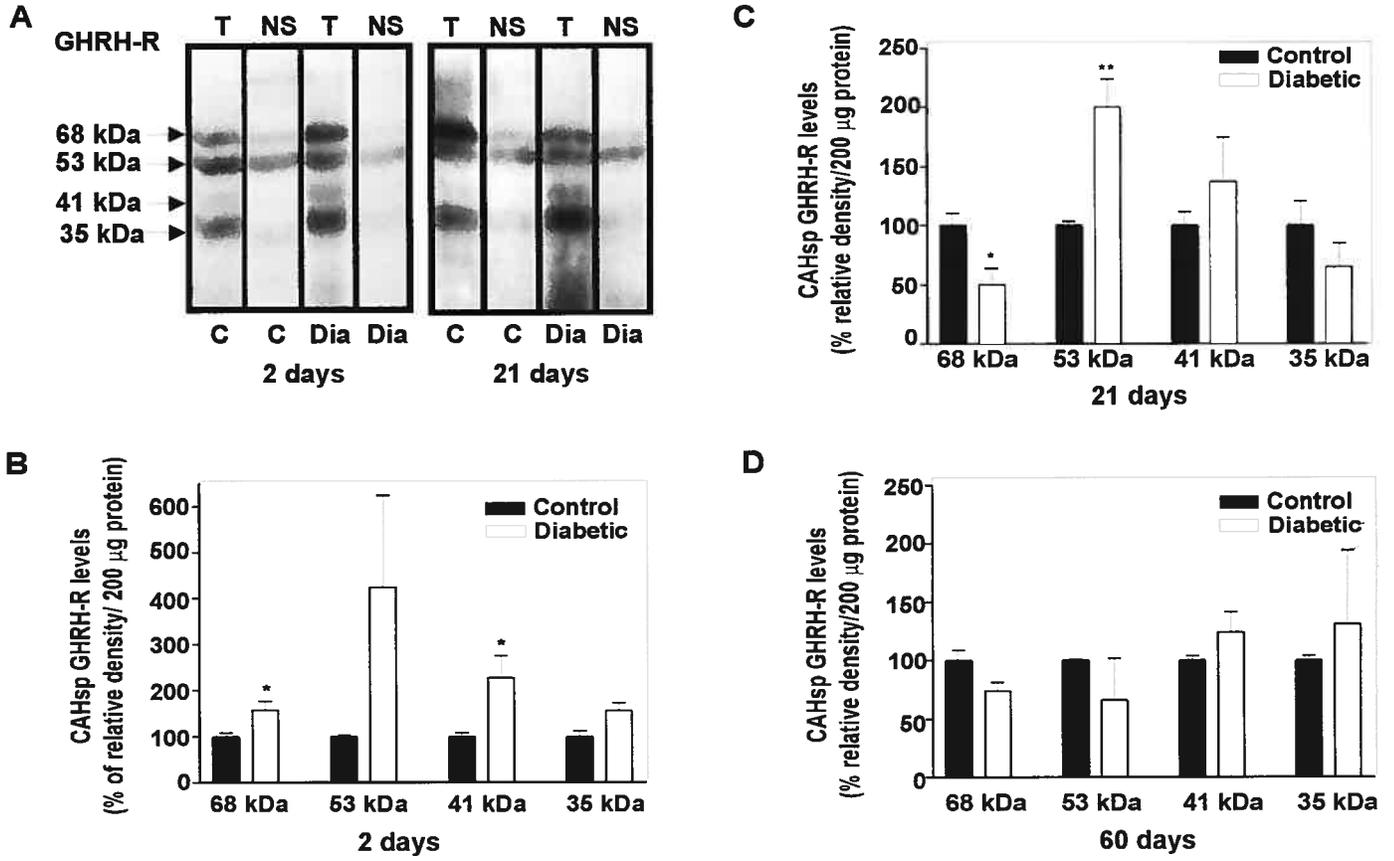
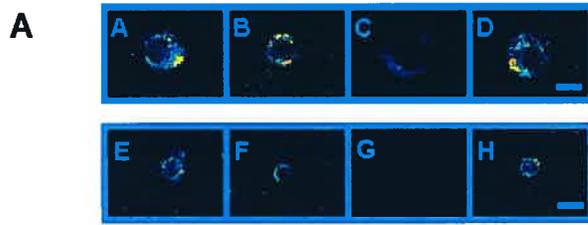
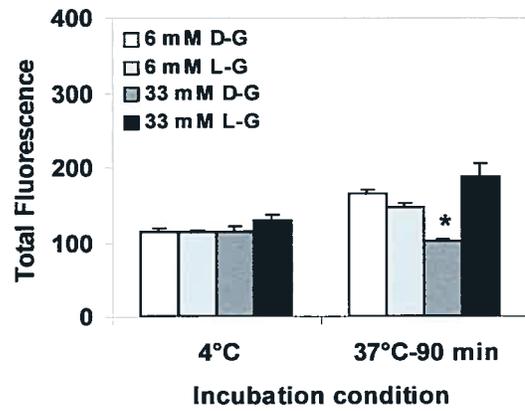
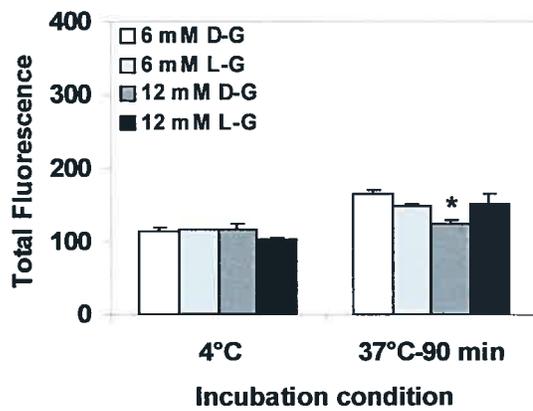


Fig. 4 Regulation of medullary thin limb Henle's loop cells ^{125}I -GHRH-GHRH-R levels of control (C) and diabetic (Dia) rats, 2, 21 and 60 days post-STZ administration. Two hundred and fifty μg protein were analyzed following cross-linking with 5 mM EDAC and SDS-PAGE. A) Autoradiographic representation of ^{125}I -GHRH-labeled complexes from one control and diabetic rat, 2 and days post-STZ administration. Lane T represents total binding and lane NS, non-specific binding in the presence of $1\ \mu\text{M}$ rGHRH(1-29) NH_2 . B), C) and D) Densities of ^{125}I -GHRH-labeled complexes expressed per 200 μg total protein in percentage of relative density to that obtained in pituitaries from control groups. Results represent the mean \pm SEM of 2-3 independent experiments performed in duplicate, using 2-3 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).

Figure 5



B B



C

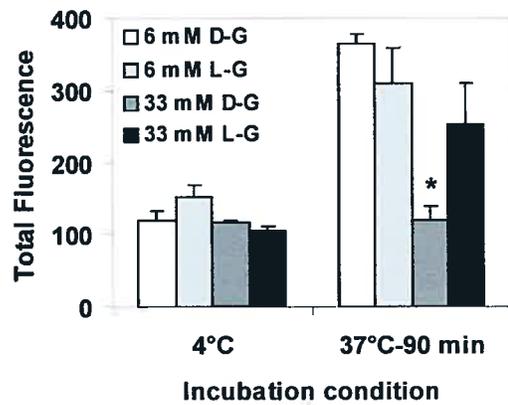
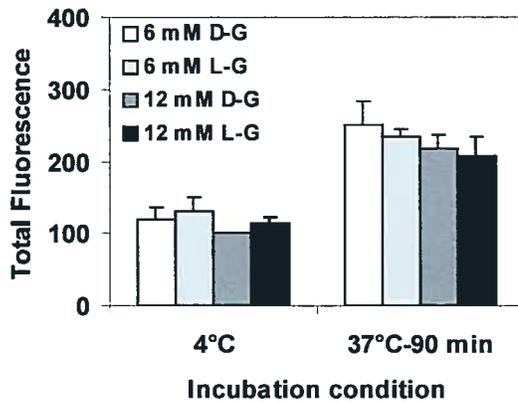


Fig 5. *In vitro* effects of D- and L-glucose on the internalization of Fluo-GHRH in hGHRH-R-transfected BHK and rat anterior pituitary. A) Visualization of Fluo-GHRH internalization in transfected BHK (A) 6 mM D-, B) 6 mM L-, C) 33 mM D- or D) 33 mM L-glucose) and normal rat anterior pituitary cells (E) 6 mM D-, F) 6 mM L-, G) 33 mM D- or H) 33 mM L-glucose) and. The cells were incubated at 4°C for 40 min in the presence of 10 nM Fluo-GHRH, washed and warmed at 37°C for 90 min. Pituitary cells were cultured 16 h in DMEM containing 6 mM D- or L- and 12 mM D- or L-glucose (B, left panel) or 6 mM D- or L- and 33 mM D- or L-glucose (B, right panel). BHK cells were cultured 72 h in DMEM containing 6 mM D- or L- and 12 mM D- or L-glucose (C, left panel) or 48 h in DMEM containing 6 mM D- or L- and 33 mM D- or L-glucose (C, right panel). Values represent the mean \pm SEM of 50-60 individual cells from 3-6 independent experiments in duplicate, for each condition. * P <0.05 in comparison to 4°C (Dunnett's test).

3. ANNEXE 1

Développement d'une technique de radioliation au GHRH dans les cellules d'anse de Henlé mince

Julie Strecko et Pierrette Gaudreau

Laboratoire de Neuroendocrinologie du vieillissement, Centre de recherche du CHUM, Hôpital Notre-Dame et Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Mots clés: GHRH-R, anse de Henlé mince, médulla rénale, radioliation, cellules dispersées

RÉSUMÉ

Une étude précédente de structure-affinité (SA), effectuées à 4°C dans des homogénats de médulla rénale, a permis de mettre en évidence des différences entre les caractéristiques de liaison du facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH) dans ce tissu en comparaison avec l'hypophyse. Récemment, le récepteur du GHRH a été localisé dans les cellules de l'anse de Henlé mince (aHm). Afin de mieux étudier ce récepteur, une technique de radioliasion avec le ^{125}I -GHRH a été développée dans ce type cellulaire à température ambiante. L'optimisation des caractéristiques de liaison du ^{125}I -GHRH dans un homogénat de médulla, à 23°C, a permis de déterminer que l'ajout de bestatine (10 μM) ou de bestatine (10 μM) et d'aprotinine (0.3 μM) augmente le pourcentage de liaison spécifique (LS) du radioligand, tout en préservant son affinité de liaison. Les cinétiques d'association du ^{125}I -GHRH et l'étude de différentes concentrations de protéine, sur le pourcentage de LS, ont permis de déterminer qu'un temps d'incubation de 60 min et qu'une concentration de 75 μg de protéine d'homogénat sont nécessaires et suffisants pour effectuer des études de liaisons à 23°C. Dans un homogénat de cellules d'aHm semi-purifié, l'omission de la diprotine dans le tampon de radioliasion a permis d'obtenir le pourcentage de LS plus élevé. Des cinétiques d'association du ^{125}I -GHRH et des études avec différentes concentrations de protéine ont permis de déterminer qu'un temps d'incubation de 60 min et que 60 μg de protéine, correspondant à 1.5×10^6 caHsp, sont nécessaires et suffisants pour réaliser des techniques de radioliasion à 23°C dans ce type cellulaire. Le développement d'une technique de radioliasion valide dans les cellules d'aHm sp permet donc la réalisation d'études de réticulation chimique avec le ^{125}I -GHRH ainsi que de nouvelles études des relations de structure-affinité du GHRH.

INTRODUCTION

Une première étude de caractérisation du site de liaison du GHRH a été réalisée dans des homogénats de médulla rénale de rat (Boulanger et coll., 2002). Elle a permis de déterminer que la liaison du [^{125}I -Tyr 10]hGHRH(1-44)NH $_2$ est saturable et réversible dans ce tissu. Toutefois, les caractéristiques de liaison du GHRH comportent certaines différences par rapport à celles retrouvées dans l'hypophyse antérieure. En effet, la radioliasion doit être réalisée à 4°C en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (bacitracine, benzamidine, diprotine, EDTA, inhibiteur de trypsine, leupeptine et PMSF) (Boulanger et coll., 2002). Dans ces conditions, l'équilibre est atteint vers 15 min et la liaison demeure stable pendant un 90 min additionnel, toutefois l'équilibre n'est pas maintenu à 23°C. Dans l'hypophyse, l'équilibre est atteint en 30 min à 23°C et en 60 min à 4°C, mais n'est pas maintenu à 23°C (Aribat et coll., 1990). Les différences pourraient en partie être reliée aux conditions de température des techniques de radioliasion, influençant la conformation optimale du GHRH-R et résultant en un état d'affinité modéré du GHRH. Ces différences sont toutefois insuffisantes pour expliquer les changements de profil d'affinité des analogues du GHRH et des différences de tailles moléculaires apparentes des entités réceptorielles liant le ^{125}I -GHRH dans l'hypophyse et le rein. Il a plutôt été proposé qu'ils soient dus à des différences de structure du récepteur du GHRH, originant de modifications post-traductionnelles (Boulanger 2002).

Suite à l'isolation des deux types cellulaires principaux de la médulla, soit les cellules de l'anse de Henlé (aH) et du tube collecteur, des essais de protection à la RNase et d'hybridation *in situ* ont permis la quantification et la localisation précise de l'ARNm du GHRH-R au niveau des cellules de l'aH mince (aHm) de la médulla (Boisvert et coll., 2002). Par ailleurs, il a été démontré que l'agoniste fluorescent, [$\text{N}\alpha$ -5-carboxyfluoresceinyl-D-Ala 2 , Ala 8 , Ala 15 , Lys 22] hGHRH-(1-29)NH $_2$ (Fluo-GHRH) s'internalise de manière température-dépendante dans les cellules d'aHm semi-purifiées (aHm sp) (Boisvert 2002).

Afin de s'approcher le plus possible de cette condition expérimentale, une technique de radioliation avec le ^{125}I -GHRH a été développée dans les cellules aHm sp à température ambiante.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériels

L'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), l'acide 2-hydroxy-éthyl-pipérazine-N'-2-éthane-sulfonique (HEPES), la bacitracine, la collagénase, l'hyaluronidase, le $MgCl_2$, le sucrose, l'albumine sérique bovine (BSA), le tris(hydroxyméthyl) aminométhane (Tris) et le 2-mercaptoéthanol provenaient de Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON). L'aprotinine, la bestatine, la chymosatine, l'inhibiteur de trypsine, la leupeptine, la pepstatine et le fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) provenaient de Boehringer Mannheim (Laval, QC). Le réactif de Bradford provenait de Bio-Rad (Mississauga, ON). Le TRIzol et le bleu de Trypan provenait de Gibco BRL (Burlington, ON). Le [^{125}I -Tyr 10]hGHRH(1-44)NH $_2$ (^{125}I -GHRH, 2,000 Ci/mmole) a été obtenu d'Amersham Canada (Oakville, ON). Les fragments et les analogues du GHRH de rat incluant le [^{127}I -Tyr 10]hGHRH(1-44)NH $_2$, hGHRH(1-29)NH $_2$, rGHRH(1-29)NH $_2$ et la diprotine ont été synthétisés dans le laboratoire du Dr. Gaudreau tel que décrit précédemment (Gaudreau et coll., 1992). Les solutions de peptides ainsi que les dilutions de peptides et d'inhibiteurs de protéases ont été fraîchement préparés avant chaque expérience.

Animaux

Des rats mâles Sprague-Dawley de deux mois (Charles River Canada, St-Constant, QC) ont été utilisés. Ils ont été hébergés à l'animalerie du Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, à l'Hôpital Notre-Dame, dans des conditions de température (22°C), d'humidité et de lumière (cycles lumière/noirceur de 12h, lumière ouverte à 07:00 h) contrôlées. Tous avaient libre accès à la nourriture et à l'eau. Les protocoles utilisés étaient approuvés par le comité institutionnel de protection des animaux en conformité avec la réglementation du Conseil Canadien de protection des animaux.

Isolation des tissus et préparation des homogénats

Les rats ont été sacrifiés par décapitation. Les reins ont été prélevés et les médullas ont rapidement été isolées sur glace. Pour les préparations d'homogénats, les médullas ont été émincées puis homogénéisées (2 x 10 sec sur glace) dans du tampon 50 mM Tris-acétate pH 7.4 contenant 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA et 250 mM sucrose (1 médulla/1 mL de tampon à 4°C), à l'aide d'un polytron (Virtis, Canberra, Parkad, Montréal, Québec). Pour les homogénats de cellules d'anse de Henlé minces semi-purifiées, les cellules ont été dispersées puis homogénéisées (1 x 2 sec sur glace) dans du tampon HEPES-Ringer (HR) (3 x 10⁷ cellules par mL de tampon HR), à l'aide d'un polytron.

Isolation des cellules de l'anse de Henlé semi-purifiées

La dispersion cellulaire a été réalisée en utilisant 2 médullas/10 mL de solution enzymatique (0.2% collagénase de type II et 0.2% hyaluronidase), tel que décrit précédemment (Boisvert et coll., 2002). Après la centrifugation à 28 g (2 min, 4°C), le culot a été resuspendu dans 3 mL de tampon HR. Cette étape a été répétée deux fois et les deux premiers surnageants ont été combinés et centrifugés à 150 g (10 min, 4°C). Le culot a été resuspendu dans 5 mL de tampon HR, incubé 10 min à 4°C et centrifugé à 150 g (10 min, 4°C). Cette étape a été répétée une fois et le culot a été resuspendu dans du tampon HR froid (3 x 10⁷ cellules/ mL). La viabilité des cellules d'aHm sp a été déterminée par la méthode du bleu de Trypan.

Radioliation du GHRH

Les dosages de radioliation ont été effectués en utilisant 50 µL d'homogénat et 35-50 pM ¹²⁵I-GHRH dans un volume total de 300 µL de 50 mM Tris-acétate (pH 7.4), contenant 5 mM MgCl₂, 0.42 % BSA et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (5 mM EDTA, 100 µM leupeptine, 100 µM bacitracine, 1 mM benzamidine, 0.1 mg/mL inhibiteur de trypsine, 250 µM PMSF) (cocktail de base) (Boulangier et coll., 2002). La liaison non spécifique a été déterminée en présence de 1 µM de rGHRH(1-29)NH₂. L'incubation a été réalisée à 4°C ou à 23°C durant 60 min ou durant des périodes variant de 2 à 120 min. La réaction a

été arrêtée en transférant 250 μL de mélange dans des eppendorfs sur glace, puis par centrifugation à 12,000 g (5 min, 4°C). Des expériences ont été réalisées à 23°C, en faisant varier la concentration des inhibiteurs de protéases déjà présents dans le cocktail de base et en ajoutant des nouveaux inhibiteurs de protéases tels que la chymostatine (1-10 μM), la pepstatine (1-10 μM), la bestatine (1-10 μM) et l'aprotinine (0.1-0.9 μM). Le tampon HR a été évalué comme tampon d'incubation substitut. Finalement, certaines expériences ont été réalisées en faisant varier la concentration protéique de 25 à 300 $\mu\text{g}/\text{tube}$ de raidoliation soit de 0.3 à 7.0 $\times 10^6$ cellules d'aHm sp.

Analyse des données

Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm l'erreur type (SEM). Le test de t de *Student* a été utilisé pour comparer les données. Le niveau de significativité a été établi à $P < 0.05$. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel Prism (GraphPad, San Francisco, CA).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Optimisation des paramètres de la liaison du ^{125}I -GHRH dans un homogénat de médulla de rein

Afin d'obtenir un degré de liaison spécifique et un rapport B/T acceptable (concentration de radioligand spécifiquement lié/ concentration totale de radioligand) à 23°C, le cocktail d'inhibiteurs de protéases utilisé par Boulanger et coll. (2002) a d'abord été modifié. L'augmentation de la concentration EDTA de 5 mM à 7.5 ou 10 mM a fait chuter le degré de liaison spécifique (LS) à 22% (non illustré). Comme les autres inhibiteurs présents dans le cocktail se trouvaient déjà en concentration maximale, l'ajout de nouveaux inhibiteurs au tampon de radioliasion a été envisagé. L'addition de 1 μM ou 10 μM de chymostatine (inhibiteur spécifique des α -, β -, γ - et δ -chymotrypsines), de 1 μM ou 10 μM de pepstatine (inhibiteur des protéases acides), de 1 μM ou 10 μM de bestatine (inhibiteur des aminopeptidases) et de 0.1 μM , 0.3 μM , 0.6 μM ou 0.9 μM d'aprotinine (inhibiteur des protéases à sérine) a été évaluée. Tel que présenté au Tableau 1, l'addition de 10 μM de bestatine et 0.3 μM d'aprotinine a permis l'obtention du degré de LS le plus élevé (60%). L'addition de chymostatine a inhibé complètement la LS du ^{125}I -GHRH (non illustré). La pepstatine a donné un pourcentage de LS (42%) similaire au cocktail de base (46%), mais un pourcentage d'inhibition de la LS plus faible (~30%), en présence d'une concentration de 10 nM de rGHRH(1-29)NH₂ (non illustré). Comparé au cocktail de base, l'addition de bestatine (10 μM) ou de bestatine (10 μM) en combinaison avec l'aprotinine (0.3 μM) a permis l'obtention d'un pourcentage de LS et un niveau B/T significativement plus élevé, tout en préservant l'affinité de liaison au GHRH. Les résultats indiquent que le nouveau cocktail bloque plus efficacement la protéolyse du GHRH-R et/ou du ^{125}I -GHRH.

Afin d'évaluer si ce nouveau cocktail permettait le maintien d'un état d'équilibre durant une période expérimentalement suffisante pour obtenir des résultats fiables, des cinétiques d'association du ^{125}I -GHRH ont été réalisées dans des homogénats de médulla à 23°C. Ces études ont montré une stabilité du

pourcentage de LS (résultats non illustrés) et du B/T (Fig. 1A) à partir de 30 min d'incubation qui se maintient au moins jusqu'à 90 min ($P>0.05$). Un temps d'incubation de 60 min a été jugé nécessaire et suffisant pour effectuer les études de liaison à 23°C dans ces conditions expérimentales. Les résultats des études d'association, en présence de 10 μM de bestatine ou 0.3 μM d'aprotinine, n'ont pas permis d'identifier une condition de maintien d'un état d'équilibre (non illustré). Des études de l'effet de différentes concentrations de protéine sur le pourcentage de LS (résultats non illustrés) et de B/T (Fig. 1B) ont montré une grande stabilité des paramètres pour les concentrations de 25 et 75 μg de protéine d'homogénat, lorsque la technique de radioliasion est effectuée à 23°C durant 60 min. Aux concentrations de 100-300 μg de protéines, un déclin concentration-dépendante du pourcentage de LS et de B/T est observé. Lorsque les mêmes concentrations de protéines, préalablement dénaturées par la chaleur, ont été utilisées, aucune LS n'a été observée, ce qui suggère une action protéolytique résiduelle en présence de forte concentration de protéines ou de l'interférence négative sur la liaison GHRH-GHRH-R de d'autres substances présentes dans l'homogénat. Une concentration de 75 μg de protéine d'homogénat a donc été jugée acceptable.

Optimisation et caractérisation de la liaison du ^{125}I -GHRH dans un homogénat de cellules semi-purifiées d'anse de Henlé mince

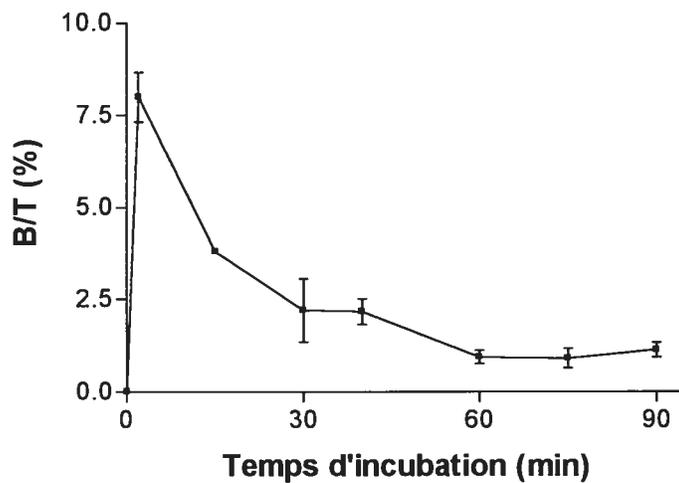
Les conditions expérimentales précédemment déterminées dans les homogénats de médulla (Tableau 2) ont été évaluées dans des homogénats de cellules d'aHm sp en comparaison à ceux de la médulla. Avec le tampon optimisé, le pourcentage de LS n'était pas significativement différent entre les homogénats de médulla et ceux des cellules de l'aHm sp, toutefois il était plus faible que dans les études antérieures (Tableau 1). Il est à noter qu'un nouveau lot de diprotine a été utilisé dans ces expériences et que le pourcentage de LS obtenu précédemment (Tableau 1) n'a pu être retrouvé après de nombreuses expériences. Aucune différence significative n'a été observée concernant le pourcentage de LS entre le tampon optimisé, celui sans diprotine, celui sans BSA et celui sans diprotine ni BSA, dans les homogénats de médulla. Toutefois, lorsque le tampon ne contenait pas de diprotine, une diminution significative du pourcentage B/T a été observée. Dans les

homogénats de cellules de l'aHm sp, le tampon sans diprotine a permis l'obtention d'un pourcentage de LS significativement plus élevé, sans altérer le pourcentage B/T. Ce tampon a donc été utilisé pour faire les expériences subséquentes. Le tampon HR a également été évalué avec le cocktail d'inhibiteurs optimisé pour homogénat de médulla, mais le pourcentage de LS obtenus était plus faible (20-35%) que dans le tampon Tris.

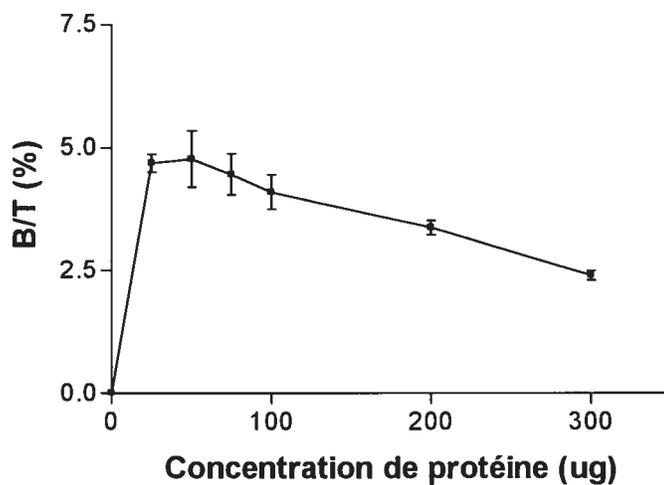
Les cinétiques d'association du ^{125}I -GHRH effectuées à 23°C, dans des homogénats de cellules de l'aHm sp montrent une stabilité de la LS (résultats non illustrés) et du pourcentage B/T (Fig. 2A) à partir de 30 min jusqu'à au moins 90 min ($P>0.05$). Un temps d'incubation de 60 min a donc été jugé nécessaire et suffisant pour effectuer les études de liaison du ^{125}I -GHRH à 23°C dans nos conditions expérimentales. L'effet de la concentration de protéine sur le pourcentage de LS (résultats non illustrés) et de B/T (Fig. 2B) a également été évalué. Une stabilité des paramètres de liaison a été obtenue avec des concentrations de protéines entre 30 et 85 μg , soit de 0.75 à 2×10^6 cellules, lorsque la radioliasion est effectuée à 23°C durant 60 min. Lorsque les mêmes concentrations de protéines, préalablement dénaturées par la chaleur, ont été utilisées, aucune LS n'a été observée. Une concentration de 60 μg de protéines, correspondant à 1.5×10^6 cellules de l'aHm sp, a donc été jugée acceptable pour réaliser des radioliasion à 23°C dans ce type cellulaire.

Figure 1.

A)



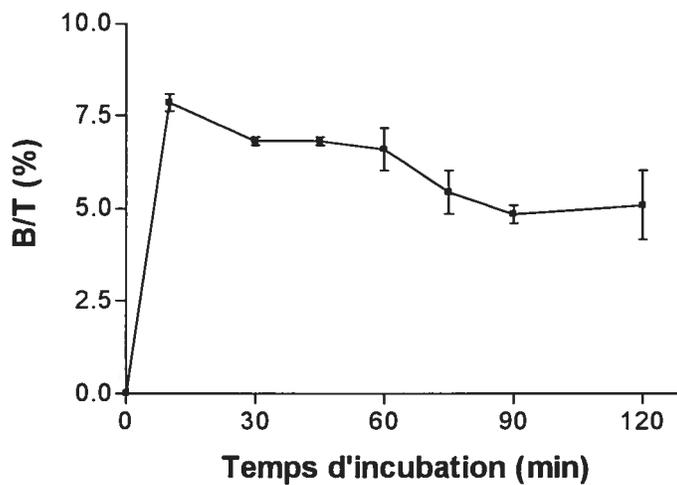
B)



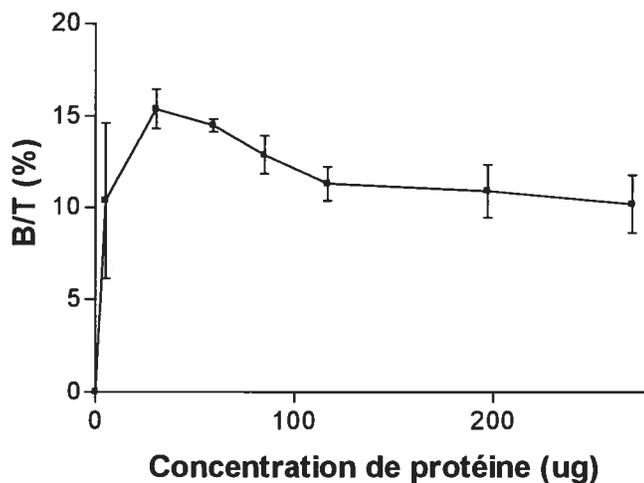
A) Profil de la cinétique d'association du ^{125}I -GHRH à 23°C, dans un homogénat de médulla rénale. B) Effet de la concentration protéique sur la liaison spécifique du ^{125}I -GHRH à 23°C, durant 60 min. B/T représente la concentration de radioligand spécifiquement lié / concentration de radioligand total. Les données représentent la moyennes \pm erreur type de 3 expériences indépendantes, effectuées en triplicata.

Figure 2

A)



B)



A) Profil de la cinétique d'association du ^{125}I -GHRH à 23°C , dans un homogénat de cellules d'aHm sp. B) Effet de la concentration protéique sur la liaison spécifique du ^{125}I -GHRH à 23°C , durant 60 min. B/T représente la concentration de radioligand spécifiquement lié / concentration de radioligand total. Les données représentent la moyennes \pm erreur type de 3 expériences indépendantes, effectuées en triplicata.

Tableau 1. Optimisation du cocktail d'inhibiteurs de protéases du tampon de radioliation du ^{125}I -GHRH dans un homogénat de médulla.

Inhibiteurs de protéases	Liaison spécifique (%)	B/T (%)	Inhibition en présence de 10 nM rGHRH(1-29)NH ₂ (%)
Tampon de base	46.2 ± 5.7	1.5 ± 0.6	49.8 ± 9.1
10 µM bestatine	52.5 ± 3.4*	2.5 ± 0.7*	54.7 ± 3.4
0.1 µM aprotinine	44.6 ± 8.7	2.1 ± 0.8	51.7 ± 0.4
0.3 µM aprotinine	47.8 ± 8.0	2.4 ± 0.8	54.0 ± 1.9
10 µM bestatine + 0.3 µM aprotinine	60.5 ± 6.3*	3.2 ± 0.3*	56.9 ± 0.4

B/T : concentration (cpm: count per min) de radioligand spécifiquement lié/concentration (cpm) totale de radioligand.

Le tampon de base contenait : 50 mM Tris-acétate (pH7.4), 5 mM MgCl₂, 0.42 % BSA , 5 mM EDTA, 1 mM diprotine, 100 µM leupeptine, 100 µM bacitracine, 1 mM benzamidine, 0.1 mg/mL inhibiteur de trypsine, 250 µM PMSF.

La radioliation a été réalisée à 23°C, durant 60 min.

* $P < 0.05$ en comparaison au cocktail de base.

Les données représentent la moyenne ± erreur type de 3 à 6 expériences indépendantes, effectuées en triplicata.

Tableau 2. Optimisation du cocktail d'inhibiteurs de protéases du tampon de radioliasion du ^{125}I -GHRH dans un homogénat de cellules d'aHm sp.

Tampons de radioliasion	Homogénat de cellules d'aHm sp		Homogénat de médulla de rein	
	LS (%)	B/T (%)	LS (%)	B/T (%)
Tampon optimisé	32.9 ± 16.9	4.8 ± 3.0	44.8 ± 5.9	4.2 ± 1.3
Tampon sans diprotine	57.2 ± 5.7*	6.7 ± 0.1	44.7 ± 1.1	2.7 ± 1.1*
Tampon sans BSA	32.3 ± 6.4	6.6 ± 2.5	51.4 ± 4.1	5.8 ± 1.0
Tampon sans diprotine et BSA	35.4 ± 14.8	4.7 ± 1.3	43.4 ± 3.5	2.7 ± 0.9*

B/T : concentration (cpm: count per min) de radioligand spécifiquement lié/concentration (cpm) totale de radioligand.

Le tampon optimisé contenait : 50 mM Tris-acétate (pH7.4), 5 mM MgCl_2 , 0.42 % BSA , 5 mM EDTA, 1 mM diprotine, 100 μM leupeptine, 100 μM bacitracine, 1 mM benzamidine, 0.1 mg/mL inhibiteur de trypsine, 250 μM PMSF, 10 μM bestatine et 0.3 μM aprotinine.

La radioliasion a été réalisée à 23°C, durant 60 min.

* $P < 0.05$ en comparaison au tampon optimisé.

Les données représentent la moyenne ± erreur type de 2 à 4 expériences indépendantes, effectuées en triplicata.

BIBLIOGRAPHIE

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.

Boisvert C, Paré C, Veyrat-Durebex C, Robert A, Dubuisson S, Morel G, Gaudreau P 2002 Localization and regulation of a functional growth hormone-releasing hormone receptor in the rat renal medulla. *Endocrinology* 143: 1475-1484.

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.

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.

4.0 DISCUSSION

4.1 Le diabète

Mondialement, le diabète afflige de plus en plus de personnes. En 15 ans, selon l'organisation mondiale de la santé, la population mondiale diabétique est passée de 30 à 177 millions en 2002 (site internet de l'OMS). Au Canada, le diabète est la septième cause de décès (site internet Santé Canada 2002). Le diabète de type 1 affecte 10% des personnes diabétiques. Il est caractérisé par une destruction sélective des cellules β du pancréas. L'insuline, produite par ces cellules, est une hormone indispensable à l'utilisation de glucose par les tissus et au maintien de la glycémie. Le Canada fait partie des pays qui ont le taux d'incidence de diabète de type 1 le plus élevé chez la population âgée de 0 à 14 ans ($>20/100,000$ par année) (Karvonen et coll., 2000). L'incidence augmente de 3% par année, depuis 10 ans (Karvonen et coll., 2000). Le diabète de type 2 est beaucoup plus fréquent. Il est caractérisé par une incapacité de l'organisme à réagir à l'action de l'insuline produite par le pancréas (site internet de santé Canada 2002). La rétinopathie et la néphropathie constituent les complications microvasculaires les plus importantes du diabète. Cette dernière se développe habituellement chez 30 à 40% des patients diabétiques de type 1 (Andersen et coll., 1985 ; Krolewski et coll., 1985). La néphropathie diabétique est précédée par une hypertrophie rénale et une augmentation de la perfusion et de la filtration glomérulaire. La GH serait un facteur permissif pour le développement de la néphropathie diabétique (Gowri et coll., 2003; Cummings et coll., 1998).

Au cours du développement du diabète de type 1 chez le rat, plusieurs perturbations de l'axe somatotrope ont été rapportées, incluant une diminution de la sécrétion de la GH (Tannenbaum et coll., 1981; Ndon et coll., 1992; Olchovsky et coll., 1990). Suite à un diabète induit à la STZ, une diminution de la sécrétion de GH est observée (Tannenbaum et coll., 1981). Le contenu hypothalamique en GHRH est augmenté 2-4 jours post-STZ, retourne à des niveaux normaux 7 j post-STZ et diminue par la suite (Leidy et coll., 1995). Aucune étude n'existe sur la régulation du GHRH-R au cours de l'évolution de cette pathologie, bien qu'il s'agisse d'un élément clé de la fonctionnalité de la cellule somatotrope.

Compte-tenu des données rapportées dans la littérature sur les altérations de l'axe somatotrope hypophysaire et rénal, l'objectif de cette étude était donc de quantifier et de caractériser le GHRH-R (ARNm et protéine) dans l'hypophyse et la médulla rénale chez le rat diabétique de type 1, en fonction de la durée et de la sévérité du diabète. La régulation de l'expression de l'ARNm du GHRH-R de la MR ainsi que le récepteur lui-même a été comparée à celle de l'hypophyse puisque la présence d'un récepteur fonctionnel y a été mise en évidence (Boisvert et coll., 2002). Une technique de radioliation à 23°C a été mise au point dans des cellules aHsp afin de quantifier plus précisément les entités du GHRH-R présentes dans ce type cellulaire. Finalement, l'effet *in vitro* de l'hyperglycémie sur l'internalisation du GHRH-R médié par le GHRH a été étudié dans des cellules d'hypophyse antérieure de rat et des cellules BHK transfectées avec le hGHRH-R, afin de vérifier l'hypothèse que la glucotoxicité cellulaire puisse être une cause importante de perturbation du GHRH-R au cours de cette pathologie.

Plusieurs études ont rapporté des effets du diabète sur l'axe somatotrope. Une diminution de la GH (Boujon et coll., 1995), une augmentation du GH-R (Menon et coll., 1994), une augmentation ou une diminution d'IGF-I et de son récepteur, une diminution ou aucun changement de la SRIF (Olchovsky et coll., 1990) et une diminution du GHRH (Lewis et coll., 1989) au niveau hypophysaire, hypothalamique et/ou rénal, chez le rat diabétique. Les résultats contenus dans ce mémoire sont les premiers à mettre en évidence une régulation du GHRH-R dans l'hypophyse et la médulla de rein dans un modèle de rat diabétique de type 1.

4.2 Validité du modèle de diabète de type 1

Un diabète à court et à long terme ont été étudiés afin de mieux identifier les effets de la durée et la sévérité de cette pathologie sur la régulation du GHRH-R. Un diabète de type 1 a donc été induit, chez des rats Sprague Dawley, par une injection à la STZ. Cette intervention a pour effet de détruire les cellules β du pancréas et permet ainsi, l'inhibition de la production d'insuline. Ce modèle a été utilisé pour étudier les effets du diabète sur l'axe somatotrope et il a été démontré que les effets observés étaient reliés à la condition diabétique et non à une toxicité

de la STZ. En effet, une normalisation des niveaux d'insuline peut renverser totalement les altérations (Gonzalez et Jolin, 1985).

Le diabète de type 1 a été confirmé dans les deux colonies de rats étudiées par la manifestation d'une hyperglycémie, glycosurie, polyurie, polydipsie, hyperphagie, cétonurie et diminution de poids corporel aux différents temps étudiés.

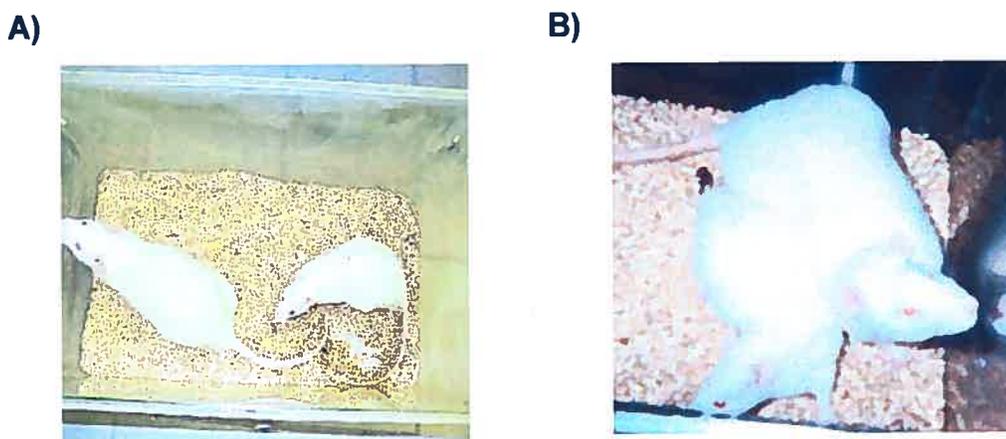


Figure 1 Représentation photographique A) Rat témoin (gauche) et diabétique (droite) 21 jours post-STZ, B) Rat témoin (droite) et rat diabétique (gauche) 60 jours post-STZ.

Une augmentation du poids des reins a aussi été observée 2 jours post-STZ. Cette hausse a également été observée dans les études antérieures (Muchaneta-Kubara et coll., 1994). Elle est en partie due à une hypertrophie cellulaire, puisque qu'une augmentation du poids sec est moindre que celle du poids humide, mais également à une hyperplasie puisque le contenu en ADN est augmenté significativement (Muchaneta-Kubara et coll., 1994). Une élévation des niveaux d'IGF-I semble précéder cette élévation de la taille du rein (Bonisch-Schnetzler et coll., 1989 ; Flyvberg et coll., 1988, 1989), suggérant un rôle de l'IGF-I dans ce phénomène.

Une augmentation de la longueur de l'aH ascendante épaisse a aussi été rapportée, parallèlement à l'augmentation du poids du rein, chez le rat diabétique entre 10 et 50 j suite à l'administration de STZ (Rasch et coll., 1995).

4.3 Quantification des niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire et rénal au cours du diabète

Dans l'hypophyse antérieure, des études ont démontré que le système GHRH-GHRH-R joue un rôle critique dans la sécrétion et la synthèse de GH (Tannenbaum et coll., 1984 ; Barinaga et col., 1985), ainsi que dans la prolifération et la différenciation des cellules somatotropes (Mayo et coll., 1988 ; Billestrup et coll., 1986 ; Godfrey et coll., 1993 ; Lin et coll., 1993). Chez le rat diabétique de type 1, plusieurs perturbations de l'axe somatotrope ont été observées. Il est donc possible que le GHRH-R le soit également. Dans le rein, le GHRH-R pourrait être impliqué dans l'hyperplasie des cellules rénales observée chez le rat diabétique de type 1. Plus précisément, il pourrait être impliqué dans la prolifération des cellules aHm sp puisque des résultats préliminaires ont mis en évidence l'implication du GHRH-R rénal au niveau de leur prolifération *in vitro*. Une étude de la régulation *in vivo* des niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire et rénal chez des rats diabétiques de type 1 (diabète induit à la STZ) a donc été entreprise.

Dans l'hypophyse des rats diabétiques, le niveau des transcrits d'ARNm de 2.5 et 4.0 kb du GHRH-R sont soumis à une régulation complexe, dépendant de la durée et de la sévérité du diabète. Un diabète de courte durée régule à la hausse les niveaux hypophysaires d'ARNm du GHRH-R. En effet, 2 j post-STZ, temps où aucun changement ne survient dans la prise alimentaire des rats diabétiques, le transcrit de 2.5 kb, correspondant au récepteur fonctionnel, était augmenté significativement. Comme le contenu hypothalamique du GHRH est augmenté de 1.4 fois entre 2 et 4 j post-STZ (Leidy et coll., 1995), mais diminue significativement par la suite (Leidy et coll., 1995; Bussiguina et coll., 2000), il est proposé que le transcrit de 2.5 kb soit soumis à une régulation positive par le GHRH dans les premiers stades du diabète. À long terme (60 j post-STZ), seul le transcrit de 4 kb demeure élevé. Ce transcrit pourrait être une isoforme du GHRH-

R, ou encore un transcrite d'ARNm du GHRH-R lié à une protéine adaptatrice, prévenant sont expression optimale (Zimber et coll., 2004). Cette augmentation du transcrite de 4 kb pourrait être associée avec une diminution de la concentration du GHRH-R fonctionnel tel que proposé lors du vieillissement (Girard et coll., 1999). Toutes les études de liaison réalisées avec le ^{125}I -GHRH ont montré que lorsque le ratio 4/2.5 kb augmente, le nombre de site de liaison à haute affinité du GHRH diminue significativement (Girard et coll. 1999)

L'étude des transcrits d'ARNm du GHRH-R rénal au cours du diabète a montré une régulation différentielle selon la durée du diabète. Contrairement au GHRH-R hypophysaire, les niveaux d'ARNm du récepteur rénal étaient significativement diminués dans un diabète à court et à long terme. Il est donc suggéré qu'une implication du GHRH dans cette régulation soit d'origine médullaire (Matsubara et coll., 1995). Le GHRH pourrait exercer ici une régulation négative du GHRH-R. D'autres GPCR subissent une régulation négative de leurs niveaux d'ARNm chez le rat diabétique induit à la STZ. En effet, les niveaux d'ARNm du récepteur de l'angiotensine II (AT1) dans les cellules du tubule proximal rénal sont significativement réduits (Cheng et coll., 1994; Marcinkowski et coll., 1997). Cette régulation négative des niveaux d'ARNm est due à une élévation des concentrations de Ca^{2+} intracellulaire (Marcinkowski et coll., 1997). L'hyperglycémie chez le rat diabétique crée en effet une élévation des niveaux de base de Ca^{2+} dans la cellule. Cette hausse est aussi observée dans les cellules de l'aH (Garland et coll., 1991; Hebert et coll., 1997). Comme pour le récepteur AT1, les niveaux d'ARNm du GHRH-R pourraient être régulés indirectement à la baisse suite à cette augmentation de Ca^{2+} intracellulaire.

Cette régulation tissu-spécifique est également observée au niveau du GH-R et de l'IGF-I. En effet, l'ARNm du GH-R et d'IGF-I augmente dans le rein total, mais diminue dans le foie après l'induction du diabète (Menon et col., 1994; Catanese et coll., 1993; Bach et coll., 1992). Ce qui démontre une régulation tissu-spécifique de plusieurs composantes de l'axe somatotrope.

4.4 Régulation du GHRH-R hypophysaire et rénal

Dans l'hypophyse, Boulanger et coll. (2002) ont observé des complexes de 28, 47 et 65 kDa. Dans la présente étude, des complexes radioactifs de 28, 45 et 72 kDa ont été obtenus. Cette légère différence entre la taille des complexes obtenus dans les deux études s'explique par la précision des standards de poids moléculaires utilisés, le "Precision Plus Protein Standard" comparativement au standard "Kaleidoscope" utilisé par Boulanger et coll. La migration en parallèle de ces deux standards a permis d'expliquer l'écart entre la taille des entités des deux études. Le récepteur fonctionnel du GHRH correspond à l'entité de 45 kDa. En effet, des études ont identifié un ADNc de 1629 bases, encodant une protéine de 423 aa et d'un poids moléculaire apparent de 47 kDa, comme étant le GHRH-R fonctionnel impliqué dans les effets physiologique du GHRH (Mayo, 1992). L'entité de 28 kDa pourrait résulter d'une protéolyse des complexes durant le processus de réticulation du GHRH-R. L'entité de 72 kDa pourrait être une isoforme plus longue du GHRH-R obtenue par épissage alternatif (Mayo, 1992). Chez le rat, une isoforme du GHRH-R, générée par ce processus, a été rapportée (Mayo, 1992; Zeitler et coll., 1998). Des récepteurs de la même famille que le GHRH-R, tel celui du glucagon et du PACAP, présente eux aussi une telle hétérogénéité générée par ce processus (Splengler et coll., 1993; Maget et coll., 1994; Vertongen et coll., 1995). Les entités de hauts poids moléculaires pourraient par ailleurs être dues à la glycosylation du récepteur, tel que rapporté dans l'hypophyse de bœuf et de mouton (Horikawa et coll., 2001). Dans l'hypophyse de mouton et dans les cellules transfectées avec le hGHRH-R, la forme glycosylée du GHRH-R de 45 kDa constitue une entité de 55 kDa (Mayo, 1992). Une hétérogénéité dans les poids moléculaires apparents du récepteur du PACAP et du VIP, lié à leur glycosylation, a également été observée (Fabre et coll., 1993; Cao et coll., 1994). Comme des sites potentiels de N-glycosylation ont été identifiés dans la structure primaire de la protéine de 47 kDa du GHRH-R, l'hypothèse d'une glycosylation est envisageable (Mayo, 1992; Lin et coll., 1992; Gaylinn et coll., 1993; Hsiung et coll., 1993). Afin de vérifier celle-ci, il sera nécessaire de faire des études de déglycosylation du GHRH-R hypophysaire de rat.

Plusieurs études ont déjà démontré l'effet du diabète sur l'axe somatotrope. Toutefois, cette étude est la première à montrer une régulation du GHRH-R au cours de cette pathologie. Dans l'hypophyse des rats diabétiques, une augmentation de l'entité de 72 kDa a été observée à 21 j post-STZ. Celle de 45 kDa est demeurée inchangée jusqu'à 60 j post-STZ où elle a diminué. Il est possible que le récepteur du GHRH soit immédiatement glycosylée (hausse de l'entité de 72 kDa), ce qui pourrait expliquer cette régulation négative du GHRH-R fonctionnel de 45 kDa. L'état d'hyperglycémie chez les rats diabétiques pourrait engendrer une réaction de glycosylation non enzymatique du GHRH-R tel que dans les réactions de glycation avancées. Alternativement, il peut être postulé qu'un tel environnement hyperglycémiant favorise la formation d'homodimères (72 kDa) à partir du complexe de 45 kDa.

Dans le rein, Boulanger et coll. (2002) ont observé des complexes radioactifs de 38, 55 et 65 kDa. Ces expériences ont été réalisées dans des homogénats de médulla de rein à 4 °C. Toutefois celles réalisées dans les homogénats hypophysaires ont été réalisées à 23 °C. Afin de comparer les entités réceptorielles de ces deux tissus et, suite à la localisation récente du GHRH-R dans les cellules de l'aHm sp, une technique de radioliation avec le ^{125}I -GHRH a été développée dans ces cellules à température ambiante. L'étude du GHRH-R rénal demande une attention particulière puisque ces cellules renferment une activité protéolytique très élevée. Ainsi, tel que démontré précédemment par Boulanger et coll. (2002), l'addition d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases complexe est nécessaire pour réaliser des dosages de radioliation. L'ajout de 10 μM bestatine et 0.3 μM aprotinine au tampon de base utilisé à 4 °C a permis d'optimiser les paramètres de liaison du ^{125}I -GHRH dans un homogénat de médulla rénale. Lors de l'essai de ce tampon avec un homogénat de cellules aHm sp, le pourcentage de liaison spécifique (LS) et le rapport B/T étaient moins élevés. Néanmoins, l'omission de la diprotine a permis d'obtenir un pourcentage de LS et de B/T deux fois plus élevés. Finalement, des cinétiques d'association et des études de l'effet de la concentration protéique ont permis de déterminer qu'un temps de 60 min et 1.5×10^6 cellules d'aHm sp sont nécessaires afin d'obtenir des

paramètres de liaison du ^{125}I -GHRH acceptables dans un homogénat de telles cellules.

Cet étude de radioliasion a permis de mettre en évidence, par réticulation chimique, des complexes ligand-récepteur de 35, 41, 53 et 68 kDa, différents de ceux obtenus dans l'hypophyse. Cette différence entre les entités des deux tissus pourrait être le résultat d'un processus post-traductionnel tissu-spécifique. Comme dans l'hypophyse, les entités de faible poids moléculaire (35 et 41 kDa) pourraient résulter d'une protéolyse des complexes durant le processus de réticulation du GHRH-R. Celles de haut poids moléculaires (53 et 68 kDa) pourraient être des isoformes plus longues du GHRH-R obtenu par épissage alternatif (Mayo, 1992), ou des formes glycosylées du GHRH-R. L'entité de 68 kDa pourrait également être le résultat d'une homodimérisation.

Tel que rapporté pour la régulation des niveaux d'ARNm du GHRH-R chez les rats diabétiques, une régulation tissu-spécifique est aussi obtenue pour le GHRH-R lui-même. Il semble qu'une augmentation importante de la traduction de l'ARNm du GHRH-R se produit dès le deuxième jour post-STZ. En effet, les complexes protéiques sont régulés à la hausse 2 j après l'induction du diabète. Cette augmentation du GHRH-R à court terme pourrait indiquer un rôle de ce récepteur dans la prolifération cellulaire rénale qui survient tôt dans la pathologie. Dès 2 j post-STZ, une augmentation significative du poids des reins a été observée. À 21 j post-STZ, l'entité de 53 kDa est augmentée tandis que celle de 68 kDa est régulée à la baisse. Toutefois, à long terme, le GHRH-R rénal ne semble pas affecté. Cette normalisation à 60 j post-STZ pourrait s'expliquer par le fait que les niveaux d'ARNm du récepteur sont très tôt régulés à la baisse. Ces résultats suggèrent un effet prépondérant du GHRH-R au cours de la phase initiale du diabète de type 1 chez le rat.

4.5 Effet de la glucotoxicité sur le GHRH-R

Le glucose exerce un effet toxique en déclenchant la cascade du stress oxydatif, la voie de la PKC et la glycosylation protéique. Chez les rats diabétiques,

il a été rapporté que l'hyperglycémie est responsable du stress oxydatif qui entraîne l'apoptose (Ha et coll., 2001). Une étude récente a démontré que des niveaux élevés en glucose (25 mM) *in vitro* peuvent provoquer une régulation négative du AT1 *via* une cascade de signalisation PKC-stress oxydatif-TGF- β 1 dans des cellules du tubule proximal de lapin en culture primaire (Park et Han, 2002). Comme dans le cas de ce récepteur rénal, il est possible que le GHRH-R soit affecté par l'hyperglycémie diabétique. Afin d'étudier directement le rôle de la glucotoxicité, des cellules hypophysaires et BHK en culture ont été incubées en présence de 6, 12 ou 33 mM de glucose, durant une période de temps n'affectant pas l'intégrité cellulaire. Les concentrations de 12 et 33 mM chez le rat représentent les niveaux de glucose sérique au cours du vieillissement et du diabète de type 1, respectivement. Cette étude *in vitro* a permis de proposer qu'une hyperglycémie chronique, induisant une glucotoxicité cellulaire, exerce directement et/ou indirectement des effets délétères sur le processus d'internalisation du GHRH-R et, conséquemment, sur la sensibilité des cellules au GHRH. L'affinité du ligand pour son récepteur et/ou la machinerie d'internalisation du complexe Fluo-GHRH/GHRH-R pourraient être altérés chez les rats diabétiques. Un seul site de basse affinité est présent dans des homogénats hypophysaires à 4 °C pour le [125 I-Tyr 10]hGHRH(1-44)NH $_2$ (Boulanger et coll., 2002). Si cet état d'affinité demeurait à 37 °C, le Fluo-GHRH se dissocierait rapidement et un très faible niveau de fluorescence serait détecté. Au contraire, si un état de haute affinité est maintenu à 37°C, le faible niveau de fluorescence observé pourrait être dû à une altération du processus d'internalisation. Ces études *in vitro* apportent de nouvelles hypothèses mécanistiques concernant les effets directs du glucose sur le GHRH-R, dénués d'effets compensatoires hypothalamiques ou périphériques.

4.6 Influence hormonale

Chez le rat diabétique de type 1, les niveaux sanguins de glucocorticoïdes tel que la corticostérone sont augmentés (Chan et coll., 2001). Ceux des hormones thyroïdiennes, T4 et T3, sont diminués à court terme (Ortiz-Caro et coll., 1984; Rodgers et coll., 1994). Cette régulation à la baisse est associée avec une

réduction de la libération du TRH hypothalamique (Gonzalez et coll., 1980; Besetti et coll., 1989; Rondeel et coll., 1992a). Des études ont proposé que la concentration élevée en glucose soit responsable de l'inhibition de la libération du TRH hypothalamique (Lewis et coll., 1989), tandis que d'autres ont déterminé que l'absence d'insuline en était la cause (Rondel et coll., 1992b). Dans un diabète à long terme, l'organisme tente de maintenir les niveaux de T3, l'hormone active, à la normale (Rodgers et coll., 1994).

Les glucocorticoïdes et les hormones thyroïdiennes sont nécessaires pour une expression optimale du GHRH-R dans l'hypophyse et probablement dans la MR. En effet, des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que ces hormones augmentent l'expression des niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire chez le rat, ainsi que le nombre de sites de liaison au GHRH (Miki et coll., 1995; Lam et coll., 1996; Tam et coll., 1996; Miller et Mayo, 1997; Nogami et coll., 2000; Petersenn et Schulte, 2000). Toutefois, la dynamique de changement dans les niveaux sériques hormonaux et leur récepteur tissu-spécifique sera à élucider afin d'établir un rôle causal dans la régulation de l'expression du GHRH-R hypophysaire et rénal.

4.7 Rôle du système GHRH-R dans le diabète

Le système GHRH-GHRH-R joue un rôle critique dans la sécrétion et la synthèse de GH, ainsi que dans la prolifération et la différenciation des cellules somatotropes (Mayo et coll., 1988; Billestrup et coll., 1986; Godfrey et coll., 1993; Lin et coll., 1993). Chez le rat diabétique de type 1, plusieurs perturbations de l'axe somatotrope ont été observées. La régulation des transcrits d'ARNm du GHRH-R et de sa protéine présente un mécanisme additionnel pour expliquer la capacité diminuée des cellules somatotropes à sécréter la GH chez les rats diabétiques (Tannenbaum, 1981a; Olchovsky et coll., 1996). De plus, une diminution de l'expression du GHRH-R fonctionnel dans ce modèle animal pourrait expliquer en partie la diminution de la taille de l'hypophyse antérieure, tel que chez la souris *little* où le GHRH-R n'est pas fonctionnel (Godfrey et coll., 1993; Lin et coll., 1993).

Chez les rats, 2 j post-STZ, une augmentation significative du poids des reins a été observée. La régulation *in vivo* du GHRH-R rénal suggère une implication prépondérante très tôt de ce récepteur dans l'hyperplasie des cellules aHm. Une augmentation du procédé de traduction du GHRH-R est proposée. Le GHRH-R rénal pourrait exercer son effet sur la prolifération cellulaire *via* l'une ou plusieurs des voies de signalisation de PKA, PKC et MAPK, puisque ces trois voies y sont présentes, plus particulièrement, celle de PKA et PKC dans les cellules de aHm ascendante (Terada et coll., 1995; Takahashi et coll., 1995; Gambaryan et coll., 1996), et parce que le GHRH-R hypophysaire exerce son effet sur la prolifération des cellules somatotopes *via* ces voies activantes (Chen et coll., 2000; Zeitler et coll., 2000; Pombo et coll., 2000).

4.8 Lien possible entre le vieillissement et le diabète

Le processus du vieillissement chez les mammifères est associé à une diminution de la sensibilité de l'axe somatotrope au GHRH qui se traduit par une diminution des niveaux sanguins de GH et d'IGF-I (Takahasi et coll., 1987 ; Deslauriers et coll., 1991 ; Shetty et coll., 1995). Chez le rat diabétique de type 1, la GH dans le sang est également diminuée (Tannenbaum et coll., 1981 ; Boujon et coll., 1995). La présente étude a permis de faire une constatation analogue quant à la régulation du GHRH-R. En effet, la régulation tissu-spécifique du GHRH-R dans le rein et l'hypophyse, ainsi que ses niveaux d'ARNm, chez les rats diabétiques de type 1, évoluent de façon similaire à ceux observés au cours du vieillissement (Boisvert et coll., 2002; Girard et coll., 1999). Boulanger et coll. (1999) ont rapporté que les niveaux du GHRH-R de 47 kDa diminue significativement dans l'hypophyse de rats de 8 à 18 mois, en comparaison à ceux des rats de deux mois. Chez les rats diabétiques, à 60 jours post-STZ, les niveaux du complexe de 45 kDa sont eux aussi régulés à la baisse. Quant au niveau des transcrits d'ARNm, ces deux pathologies régulent positivement l'expression du transcrit de 4.0 kb et du ratio 4.0/2.5kb (Girard et coll., 1999). Cette élévation du ratio a été associée à une diminution significative de l'affinité et du nombre de sites de liaison au GHRH (Girard et coll., 1999). Ceci pourrait expliquer en partie

l'habileté diminuée des cellules somatotropes à sécréter la GH (Tannenbaum et coll., 1981). De plus, la perte du site à haute affinité a été démontrée dans des homogénats d'hypophyses antérieures de rats âgés contrairement à ceux des rats de deux mois (Abribat et coll., 1991). Il peut alors être proposé que dans l'hypophyse de rat diabétique, du moins suite à un diabète à long terme, un site de liaison à basse affinité et haute capacité soit prédominant.

Au niveau du rein, la régulation du GHRH-R diffère de celle de l'hypophyse puisque l'effet du vieillissement et du diabète implique une diminution des niveaux d'ARNm du GHRH-R. Dans ce tissu, une seule classe de sites de liaison a été observée. Des études complémentaires de saturation pourraient être réalisées afin de confirmer les données de réticulation chimique qui suggèrent une augmentation du nombre de sites de liaison.

Ces similitudes entre le vieillissement et le diabète de type 1 quant à la régulation du GHRH-R pourrait impliquer l'hyperglycémie et la glucotoxicité. Chez le rat, les niveaux sériques normaux de glucose sont de 6 mM. Au cours du vieillissement, ces niveaux augmentent et atteignent 12 mM (Girard et coll., 1999). Chez l'humain, une étude prospective de 5 ans avec 1800 sujets, âgés entre 68 et 82 ans, a révélé que le quart des sujets avaient des glycémies entre 6.5 et 12 mM, donc un statut diabétique et glucotoxicité qui s'ignorait avant leur entrée dans l'étude (étude NuaAge, données non publiées). Le statut hyperglycémique pourrait en soi réguler directement les niveaux d'ARNm du GHRH-R. En effet, une glucotoxicité sévère est suffisante pour induire des effets délétères sur le GHRH-R lui-même et/ou la machinerie cellulaire impliquée dans son internalisation. Ces résultats suggèrent que les états diabétiques puissent servir de modèle de vieillissement accéléré, permettant ainsi de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui régissent la somatopause.

5.0 CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

Plusieurs composantes de l'axe somatotrope sont affectées au cours du diabète de type 1, toutefois aucune étude n'avait été réalisée sur le GHRH-R. Ainsi, la présente étude constitue la première à mettre en évidence une régulation tissu-spécifique du GHRH-R chez le rat diabétique de type 1. Une régulation différentielle du GHRH-R, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine, a été observée au cours de l'évolution de cette pathologie.

L'hyperglycémie chronique, provoquant une glucotoxicité cellulaire, pourrait exercer directement et/ou indirectement des effets délétères sur le GHRH-R de l'hypophyse antérieure impliquant une diminution de l'affinité de liaison du GHRH, et conséquemment, sur la sensibilité des cellules somatotropes à ce peptide. Dans le rein, elle pourrait réguler négativement le GHRH-R tel que démontré pour d'autres GPCR. Des études *in vitro* devront être réalisées dans ce tissu afin d'évaluer les effets directs de la glucotoxicité sur le GHRH-R. Il sera important d'évaluer l'effet direct de la glucotoxicité sur la régulation de l'expression du GHRH-R hypophysaire et rénal. Par ailleurs, suite aux études de réticulation chimiques, il a été suggéré que le GHRH-R puisse être glycosylé. Ainsi, des études de déglycosylation devront être réalisées afin de déterminer si les entités de haut poids moléculaire tel 68 et 72 kDa représentent des récepteurs glycosylés ou des homodimères du GHRH-R.

Des similitudes entre le rat âgé et celui diabétique ont été observées au niveau de la sensibilité du GHRH-R pour le GHRH. Ainsi, il a été proposé que ce modèle de rat diabétique puisse servir de modèle de vieillissement accéléré afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui régissent la somatopause. Toutefois des études plus approfondies sur les changements dynamiques des niveaux sériques hormonaux, chez les rats diabétiques, devront être entreprises pour confirmer l'intérêt de ce modèle et pour établir le rôle des hormones dans la régulation du GHRH-R.

Des études comparatives dans un modèle de rat diabétique de type 2, tel les rats Goto Kakizaki (GK), seraient également à envisager afin de prédire si de

telles perturbations du GHRH-R existent dans les états diabétiques débutant à l'âge adulte et se manifestant au cours du vieillissement. Les rats GK ne deviennent pas obèses, contrairement aux autres modèles de rats diabétiques de type II. Ceci est important si l'on veut étudier les effets du diabète de type 2 sans les effets confondants de l'obésité, qui diminue également la sensibilité des cellules somatotropes au GHRH (Renier et coll., 1990). Dans ce modèle, la sensibilité des neurones hypothalamiques produisant la somatostatine, le TRH et le GHRH est diminuée et l'effet est plus prononcé pour la sécrétion du GHRH (Lewis et coll., 1996).

Finalement, comme l'hyperglycémie cause une augmentation du stress oxydatif (Park et coll., 2002) et semble être une cause importante de la dérégulation du GHRH-R au cours de l'évolution du diabète, il serait d'intérêt d'évaluer l'effet protecteur des antioxydants sur le maintien de la fonctionnalité du GHRH-R au cours de cette pathologie. Le stress oxydatif pourrait avoir un effet direct sur le GHRH-R puisqu'il augmente la dénaturation des protéines membranaires (Ha et coll., 1999; Yaqoob et coll., 1994). Les antioxydants pourraient protéger le GHRH-R au cours du diabète et/ou renverser les effets délétères du stress oxydatif sur celui-ci. Si un effet est observé *in vitro*, l'impact d'une alimentation riche en antioxydant pourra être évalué dans les états diabétiques et, possiblement, le vieillissement.

6.0 BIBLIOGRAPHIE

Abou-Samra A, Juppner H, Force T, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Urena P, Richards J, Bonventre JV, Potts Jr JT, Kronenberg HM, Segre GV (1992) Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both camp and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2732-2736.

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.

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.

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.

Aguila MC, McCann SM (1985) Stimulation of somatostatin-release in vitro by synthetic growth hormone-releasing factor by a nondopaminergic mechanism. *Endocrinology* 117: 762-765.

Aguila MC, Mc Cann SM (1991) The influences of hGRF, CRF, TRH, and LH-RH on SRIF release from median eminence fragments. *Brain Res* 348: 180-182.

Aguila MC (1994) Growth hormone-releasing factor increases somatostatin release and mRNA levels in the rat periventricular nucleus via nitric oxide by activation of guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 782-786.

Albertsson-Wikland K, Rosberg S (1982) Inhibition of adenylate cyclase activity in muscles by growth hormone. *Endocrinology* 111:1855-1861.

Aleppo G, Moska Jr 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.

Andersen AR, Christiansen JS, Andersen JK, Kreiner S, Deckert T (1985) Diabetic nephropathy in type I (insulin-dependant) diabetics: an epidemiological study. *Diabetologia* 25:496-501.

Andersen PH, Gerlach LO, Hansen BS, Helmgaard L, Andreasen T, Hansen A, Olsen OH, Gaudreau P, Pedersen JT, Pharmacology, functionality, dynamics and structure activity relations of a G proteins-coupled receptor illustrated with the growth hormone releasing hormone (GHRH) receptor and GHRH(1-29)NH₂. Peptide and drug delivery. Eds: Frokjaer S, Christrup L, Krogsgaard-Larsen P. Copenhagen 1998. pp 50-60.

Andersson G, Jennische E (1988a) IGF-I immunoreactivity is expressed by regenerating renal tubular cells after ischaemic injury in the rat. *Acta Physiol Scand* 132:453-457.

Andersson GL, Skottner A, Jennische E (1988b) 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

Andreasen T, Helmgaard L, Gaudreau P, Andersen PH (1996) Growth hormone-releasing substances. In: Ranke MB, Christiansen JS, editors. *The complexity of endocrine systems*. Mannheim: Verlag, 1996. pp 1-27.

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.

Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C (1993) Identification of JACK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74: 237-244.

Aron DC, Findling JW, Tyrrell JB (1997) Hypothalamus and pituitary. *Dans Basic and clinical Endocrinology*, 5th ed.; Greenspan FS, Stewler GJ eds. Appleton and Lange, Stamford; pp 85-156.

Auernhammer CJ, Strasburger CJ (1995) Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on the immune system. *Eur J Endocrinol* 133:635-645.

Bach LA, Stevenson JL, Allen TJ, Jerums G, Herington AC (1991) Kidney insulin-like growth factor-I mRNA levels are increased in postpubertal diabetic rats. *J Endocrinology* 129: 5-10.

Bach LA, Cox AJ, Mendelsohn FAO, Herington AC, Werther GA, Jerums G (1992) Focal induction of IGF binding proteins in proximal tubules of diabetic rat kidney. *Diabetes* 41:499-507.

Bach LA (1992b) IGF-I and IGF binding proteins in diabetes-related kidney growth. *Growth Regul* 2: 30-39.

Bagnato A, Moretti C, Omishi 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.

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.

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.

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.

Bedo G, Santisteban P, Jolin T, Aranda A (1991) Expression of the growth hormone gene and the pituitary-specific transcription factor GHF-1 in diabetic rats. *Mol Endocrinol* 5: 1730-1739.

Berelowitz M, Firestone SL, Frohman LA (1981a) Effects of growth hormone excess and deficiency on hypothalamic somatostatin content and release and on tissue somatostatin distribution. *Endocrinology* 109:714-719.

Berelowitz M, Szabo M, Frohman LA, Firestone S, Chu L, Hintz RL (1981b) Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 212:1279-1281.

Berelowitz M, Dudlak D, Frohman A (1982) Release of somatostatin-like immunoreactivity from incubated rat hypothalamus and cerebral cortex. Effects of glucose and glucoregulatory hormones, *J Clin Invest* 69: 1293-1301.

Berelowitz M, Bruon JF. Metabolic regulation of growth hormone secretagogue gene expression. In: Bercu BB, Walker RF, editors. *Growth hormone secretagogues*. New York: Springer-Verlag, 1996. pp. 165-179.

Berry SA, Pescovitz OH (1988) Identification of a rat GHRH-like substance and its messenger RNA in rat testis. *Endocrinology* 123:661-663.

Besetti GE, Reymond MJ, Boujon CE, Lemarchand-Béraud T, Rossi GL (1989) Functional and morphological aspects of impaired TRH release by mediobasal hypothalamus of STZ-induced diabetic rats. *Diabetes* 38:1351-1356.

Biessels GJ, van der Heide LP, Kamal A, Bleys RLAW, Gispen WH (2002) Ageing and diabetes : implications for brain function. *European Journal of Pharmacology* 441: 1-14.

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.

Bluet-Pajot MT, Durand D, Kordon C (1983) Influence of streptozotocin-induced diabetes on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 36 :307-309.

Bodner M, Karin M (1987) A pituitary specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. *Cell* 50:267-275.

Bohlen P, Esch F, Brazeau P, Ling N, Guillemin R (1983) Isolation and characterization of the porcine growth hormone-releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 116: 726-734.

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.

Boni-Schnetzler M, Binz K, Mary JL, Schmid C, Schwander J, Froesch ER (1989) Regulation of hepatic expression of IGF I and fetal IGF binding protein mRNA in streptozotocine-diabetic rats. *FEBS Lett.* 251:253-256.

Bornfeldt KE, Amqvist HJ, Enberg B, Mathews LS, Norstedt G (1989) Regulation of insulin-like growth hormone receptor gene expression by diabetes and nutritional state in rat tissues. *J Endocrinol* 122:651-656.

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.

Boujon CE, Bestetti GE, Abramo F, Locatelli V, Rossi GL (1995) The reduction of circulating growth hormone and prolactin in streptozotocin-induced diabetic male rats is possibly caused by hypothalamic rather than pituitary changes. *J Endocrinol* 145: 19-26.

Boulanger L, Lazure C, Lefrançois L, Gaudreau P (1993) Proteolytic degradation of rat growth hormone-releasing factor (1-29) amide in rat pituitary and hypothalamus. *Brain Res* 616: 39-47.

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.

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.

Bouvier M, Moffett S, Loisel TP, Mouillac B, Hébert T (1994) La palmitoylation : une modification post-traductionnelle impliquée dans la régulation des voies de signalisation couplées aux protéines G. *Med Sci.* 10(Suppl1) :10-17.

Brazeau P, Böhlen 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.

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.

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.

Bruno JF, Song J, Xu Y, Berelowitz M (1993) Regulation of hypothalamic growth hormone-releasing factor messenger ribonucleic acid expression in food-deprived rats: a role for histaminergic neurotransmission. *Endocrinology* 133:1377-1381.

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.

Campbell RM, Scanes CG (1992) Evolution of the growth-hormone-releasing factor (GRF) family of peptides. *Growth Regul* 2: 175-191.

Cao YJ, Gimpl G, Fahrenholz F (1994) Molecular structure analysis of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor from pig brain. *Biochim Biophys Acta* 1222: 432-440.

Carlsson B, Billig H, Rymo L, Isaksson OG (1990) Expression of the growth hormone-binding protein messenger RNA in the liver and extrahepatic tissues in the rat: co-expression with the growth hormone receptor. *Mol Cell Endocrinol* 73:R1-R6.

Carter-Su C, Schwartz J, Kikuchi G. (1984) Identification of a high affinity growth hormone receptor in rat adipocyte membranes. *J Biol Chem* 259: 1099-1104.

Carter-Su C, Schwartz J, Smit LS (1996) Molecular mechanism of growth hormone action. *Annu Rev Physiol* 58 :187-207.

Casanova J, Copp RP, Janocko L, Samuels HH (1985) 5'-Flanking DNA of the rat growth hormone gene mediates regulated expression by thyroid hormone. *J Biol Chem* 260:11744-11748.

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.

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.

Ceda GP, Valenti G, Butturini U, Hoffman AR (1986) Diminished pituitary responsiveness to growth hormone-releasing factor in aging male rats. *Endocrinology* 2109-2114.

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.

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: 51-8.

Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW (1993) Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2732-2736.

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.

Cheng HF, Burns KD, Harris RC (1994) Reduced proximal tubule angiotensin II receptor expression in streptozotocine-induced diabetic mellitus. *Kidney int* 46: 1603-1610.

Chin E, Zhou J, Bondy C (1992) Renal growth hormone receptor gene expression: relationship to renal insulin-like growth factor system. *Endocrinology* 131:3061-3066.

Chomczynski P, Downs TR, Frohman LA (1988) Feedback regulation of growth hormone-releasing hormone gene expression by growth hormone in rat hypothalamus. *Mol Endocrinol* 2:236-241.

Ciampani T, Fabbri A, Isidori A, Dufau ML (1992) Growth hormone releasing hormone is produced by rat Leydig cell in culture and as a positive regulator of Leydig cell function. *Endocrinology* 131: 2785-2792.

Cohen MP, Josti K, Rye DL (1977) Somatomedin in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 45:236-239.

Collu R, Deal CL, Castagné J, Lagacé G, Ong H, Boulanger L, Gaudreau P, Goddgyer CG, Howard AD, Smith RG, Van der Ploeg LTH (1997) Presence of GHRH and GHRP receptors in human placenta. Résumé de communication présenté au 79e Congrès Annuel de l'Endocrine Society.

Cooke NE, Ray J, Watson MA, Estes PA, Kuo BA, Liebhaber SA (1988) Human growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns. *J Clin Invest* 82: 270-275.

Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park SL, Goodwin RG, March C J (1990) A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 16,265-270.

Cotecchia S, Exum S, Carron MG, Lefkowitz RJ (1990) Regions of the $\alpha 1$ -adrenergic receptor involved in coupling to phosphatidylinositol hydrolysis and enhanced sensitivity of biological function. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2896-2990.

Couvineau A, Gaudin P, Maoret JJ, Rouyer FC, Nicole P, Labuthe M (1995) Highly conserved aspartate 68, tryptophane 73 and glycine 109 in the N-terminal extracellular domain of the human VIP receptor are essential for its ability to bind VIP. *Biochem Biophys Res Chem* 269:246-452.

Crowley WR, Terry LC (1980) Biochemical mapping of somatostatinergic systems in rat brain: effects of periventricular hypothalamic and medial basal amygdaloid lesions on somatostatin-like immunoreactivity in discrete brain nuclei. *Brain Res* 200: 283-291.

Cummings EA, Sochett EB, Dekker MG, Lawson MI, Daneman D (1998) Contribution of growth hormone and IGF-I to early diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes* 47:1341-1346.

Cuttler L, Glaum SR, Collins BA, Miller RJ (1992) Calcium signalling in single growth hormone-releasing factor-responsive pituitary cells. *Endocrinology* 130:945-953.

Daikoku S, Kawano H, Noguchi M, Nakanishi J, Tokuzen M, Chihara K, Nagatsu I (1986) GRF neurons in the rat hypothalamus. *Brain res* 399: 250-261.

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.

De Almeida VI, Mayo KE (1998) Identification of binding domains of the growth hormone-releasing hormone receptor by analysis of mutant and chimeric receptor proteins. *Molecular Endocrinology* 12: 750-765.

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.

Deslauriers N, Gaudreau P, Aribat 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* 53:439-46.

Devesa J, Lois N, Arce V, Diaz MJ, Lima L, Tresguerre JAF (1991) The role of sexual steroids in the modulation of growth hormone (GH) secretion in humans. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40: 165-173.

Dickson PR, Vaccarino FJ (1990) Characterization of feeding behavior induced by central injection of GRF. *Am J Physiol* 259: R651-R657.

Dickson PR, Vaccarino FJ (1994) GRF-induced feeding: evidence for protein selectivity and opiate involvement. *Peptides* 15:1343-1352.

Duquesnoy P, Sobrier ML, Amselem S, Goosens M (1991) Defective membrane expression of human growth hormone (GH) receptor causes Laron-Type GH insensitivity syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10272-10276.

Ehlers CL, Reed TK, Henriksen SJ (1986) Effect of corticotropin releasing factor and growth hormone-releasing factor on sleep and activity in rats. *Neuroendocrinology* 42:467-474.

Esch F, Böhlen P, Ling N, Brazeau P, Guillemin R (1983) Isolation and characterization of bovine hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 117:772-779.

Etherton TD, Evoke CM (1986) Stimulation of lipogenesis in bovine adipose tissue by insulin-like growth factor. *J Anim Sci* 62: 357-362.

Evans RM, Birnberg NC, Rosenfeld MG (1982) Glucocorticoid and thyroid hormones transcriptionally regulate growth hormone gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7659-7663.

Ezzat S, Lacks D, Oster J, Melmed S (1991) Growth hormone regulation in primary fetal and neonatal rat pituitary cell cultures the role of thyroid hormone. *Endocrinology* 128:937-943.

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.

Fagin JA, Robert Jr CR, LeRoith D, Brown AT (1989) Coordinate decrease of tissue insulin-like growth factor I posttranscriptional alternative mRNA transcripts in diabetes mellitus. *Diabetes* 38:428-434.

Feifel D, Vaccarino FJ (1989) Feeding effects of growth hormone-releasing factor in rats are photoperiod sensitive. *Behav Neurosci* 103: 824-830.

Fernandez-Vasquez G, Cacicedo L, Lorenzo MJ, Tolon RM, Lopez J, Sanchez (1995) Corticosterone modulates growth hormone-releasing hormone factor and somatostatin in fetal rat hypothalamic cultures. *Neuroendocrinology* 61:31-35.

Fervenza FC, Tsao T, Hoffman AR, Rabkin R (1997) Regional changes in the intrarenal insulin-like growth factor-1 axis in diabetes. *Kidney International* 51:811-818.

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* 31:310-14.

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.

Flyvbjerg A, Bornfeldt KE, Marshall SM, Amqvist HJ, Orskov H (1990) Kidney IGF-I mRNA in initial renal hypertrophy in experimental diabetes in rats. *Diabetologia* 33:334-338.

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

Fraser RA, Siminosky K, Harvey S (1991) Growth hormone receptor gene: novel expression in pituitary tissue. *J Endocrinol* 128: R9-R11.

Freemark M, D'Ercole AJ, Handwerger S (1985) Somatomedin-C stimulates glycogen synthesis in fetal rat hepatocytes. *Endocrinology* 116: 2578-2582.

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.

French MB, Lussier BT, Moor BC, Kraicer J (1990) Effect of growth hormone-releasing factor on phosphoinositide hydrolysis in somatotrophs. *Mol Cell Endocrinol* 72:221-226.

Frohman A, Jansson JO (1986) Growth hormone-releasing hormone. *Endocr Rev* 7:223-252.

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.

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.

Frohman LA, Downs TR, Chomczynski P (1992) Regulation of growth hormone secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology* 13: 344-405.

Frohman LA. Cellular physiology of growth hormone releasing hormone. In: Bercu BB, Walker RF, editors. *Growth hormone secretagogues*. New York: Springer-Verlag, 1996. pp. 137-145.

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 Letters* 394:1-4.

Gabriel SM, Roncancio JR, Ruiz NS (1992) Growth hormone pulsatility and the endocrine milieu during sexual maturation in male and female rats. *Neuroendocrinology* 56:619-628.

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.

Garland HO, Harris PJ, Morgan TO (1991) Calcium transport in the proximal convoluted tubule and loop of Henle of rats made diabetic with streptozotocin. *J Endocrinol* 131: 373-380.

Gaudin P, Couvineau A, Maoret JJ, Rouyer FC, Laburthe M (1995) Mutational analysis of cysteine residues within the extracellular domains of the human vasoactive intestinal peptide (VIP) 1 receptor identifies seven mutants that are defective in VIP binding. *Biochem Biophys Res Commun* 211:901-908.

Gaudreau P, Boulanger L, Aribat 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.

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.

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.

Gaylinn BD, von Kap-Herr C, Golden WL, Thorner MO, (1994a) Assignment of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene (GHRHR) to 7p14 by in situ hybridization. *Genomics* 19:193-195.

Gaylinn BD, Lyons CE, Zysk JR, Clarke IJ, Thomer MO (1994b) Photoaffinity cross-linking to the pituitary receptor for growth hormone-releasing factor. *Endocrinology* 135:950-955.

Girard N, Ferland G, Boulanger L, Gaudreau P (1998) Long-term calorie restriction projects rat pituitary growth hormone-releasing hormone binding sites from age-related alterations. *Neuroendocrinology* 68:21-29.

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.

Gluckman PD, Grumbach MM, Kaplan SI (1981) The neuroendocrine regulation and function of growth hormone and prolactin in the mammalian fetus. *Endocr Rev* 2:363-395.

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.

Gonzalez C, Montoya E, Jolin T (1980) Effect of streptozotocin diabetes on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the rat. *Endocrinology* 107: 2099-2103.

Gonzalez C, Jolin T (1985) Effect of streptozotocin diabetes and insulin replacement on growth hormone in rats. *J Endocrinol Invest* 8:7-11.

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 USA* 88 : 8749-8753.

Goodman HM (1993) Growth hormone and metabolism. In: Schreiber MP, Scanes CG, Pang PKT (eds) *The endocrinology of growth, development, and metabolism in vertebrates*. Academic Press Inc San Diego, CA, pp93-115.

Gordeladze JO, Bjoro T, Torjesen PA, Ostberg BC, Haug E, Gautvik KM (1989) Protein kinase C stimulates adenylate cyclase activity in prolactin-secreting rat adenoma (GH4C1) pituitary cells by inactivating the inhibitory GTP-binding protein Gi. *Eur. J. Biochem.* 183 : 397-406.

Gorin E, Grichting G, Goodman HM (1984) Binding and degradation of [125I]human growth hormone rat adipocytes. *Endocrinology* 115: 467-475.

Gowri PM, Yu JH, Shaufi A, Sperling MA, Menon RK (2003) Recruitment of a repressosome complex at the growth hormone receptor promoter and its potential role in diabetic nephropathy. *Mol Cell Biol.* 23: 815-825.

Green IC, Southern C, Ray K (1990) Mechanism of action of growth-hormone-releasing hormone in stimulating insulin secretion in vitro from isolated rat islet and dispersed islet cells. *Horm Res* 33:199-204.

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.

Guarcello V, Weigent DA, Blalock JE (1991) Growth hormone-releasing hormone receptors on thymocytes, and splenocytes from rats. *Cell Immunol* 136: 291-302.

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.

Ha H, Yu MR, Kim KH (1999) Melatonin and taurine reduce early glomerulopathy in diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 26: 944-950.

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.

Harvey S, Hull KL (1997) Growth hormone. A paracrine growth factor? *Endocrine* 7(3):267-279.

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.

Hassan HA, HsiungHM, Zhang XY, Smith DP, Smiley DL, Heiman ML (1995) Characterization of growth hormone-releasing hormone (GHRH) binding to cloned porcine GHRH receptor. *Peptides* 16:1469-1473.

Hassan HA (2001) Biological activity of two porcine growth hormone-releasing hormone receptor isoforms. *Arch Biochem Biophys* : 387:20-6.

Hayashida CY, Gondo RG, Ferrari C, Toledo 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.

Hebert SC, Brown EM, Harris HW (1997) Role of the Ca²⁺-sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis. *J Exp Bio* 200: 295-302.

Hemming FJ, Begeot M, Dubois MP, Dubois PM (1984) Fetal rat somatotropes in vitro: effects of insulin, cortisol, and growth hormone-releasing factor on their differentiation. *Endocrinology* 114:2107-2113.

Hermansen K, Kappelgaard AM (1987) Characterization of growth hormone-releasing hormone stimulation of the endocrine pancreas: studies with alpha- and beta-adrenergic and cholinergic antagonists. *Acta endocrinol* 114:589-594.

Ho KY, Evans WS, Blizzard RM, Vedhuis JD, Merriam GR, Samojlik E, Furlanetto R, Rogol AD, Kaiser DL, Thorner MO (1987) Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 64:51-58.

Hochberg Z, Bick T, Perlman R (1988) Two pathways of placental lactogen secretion by cultured human trophoblast. *Biochem Med Metab Biol* 39: 111-116.

Holtmann MH, Hadac EM, Miller LJ (1995) Critical contributions of amino-terminal extracellular domains in agonist binding and activation of secretin and vasoactive intestinal polypeptide receptor. *Studies of chimeric receptors. J Biol Chem* 270:14394-14398.

Horikawa R, Hellmann P, Cells SG, Torsello A, Day RN, Muller EE, Thorner MO (1996) Growth hormone-releasing factor (GRF) regulates expression of its own receptor. *Endocrinology* 128:937-943.

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.

Hostetter TH, Troy JL, Brenner BM (1981) Glomerular hemodynamics in experimental diabetes. *Kidney Int* 19:410-415.

Hulting AL, Meister B, Carlsson L, Hilding A, Isaksson O (1991) On the role of the peptide galanin in regulation of growth hormone secretion. *Acta Endocrinol* 125: 518-525.

Hsiung HM, Smith DP, Zhang XY, Bennet T, Rosteck Jr PR, Lai MH (1993) Structure and functional expression of a complementary DNA for porcine growth hormone-releasing hormone receptor. *Neuropeptide* 25:1-10.

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.

Ikuyama S, Natori S, Nawata H, Kato K, Ibayashi H, Kariya T, Sakai T, Rivier J, Vale W (1988) Characterization of growth hormone-releasing hormone receptors in pituitary adenomas from patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 66:1265-1271.

Imagawa M, Chiu R, Karin M (1987) Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and camp. *Cell* 51:251-260.

Isgaard J, Nilsson A, Lindahl A, Jansson JO, Isaksson OG (1986) Effects of local administration of GH and IGF-I on longitudinal bone growth in rats. *Am J Physiol* 250: E367-E372.

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.

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.

Ishikawa M, Hiroi N, Kamioka T, Tanaka T, Tachibana T, Hishikawa H, Miyachi Y (2001) Metabolic effects of 20 kDa and 22 kDa human growth hormones on adult male spontaneous dwarf rats. *Eur J Endocrinol* 145: 791-797.

Jansson J, Eden S, Isakson O (1985) Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 6:128-150.

Jelinek LJ, Lok Rosenberg GB, Smith RA, Grant FJ, Biggs S, Bensch PA, Kuijper JL, Sheppard PO, Sprecher CA, O'Hara PJ, Foster J, Walker KM, Chen LHJ, McKernan PA, Kindsvogel W (1993) Expression cloning and signaling properties of the rat glucagons receptor. *Science* 259:1614-1616.

Jialal I, Nathoo BC, Joubert S, Asmal AC, Pillay NL (1982) The clinical and biochemical of acromegaly and gigantism. *S Afr Med J* 61: 617-620.

Joanny P, Peyre G, Steinberg J, Guillaume V, Pesce G, Becquet D, Olivier C (1992) Effetc of diabetes on in vivo and in vitro hypothalamic somatostatin release. *Neuroendocrinology* 55:485-491.

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.

Juppner H, Abou-Samra A, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski Jr LF, Hock J, Potts Jr JT, Kronenberg HM, Segre GV (1991) A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 254:1024-1026.

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.

Karam JH (1997) Hypoglycemic disorders. Dans *Basic and clinical Endocrinology*, 5th ed.; Greenspan FS, Strewler GJ eds. Appleton and Lange, Stamford; pp 664-679.

Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J (2000) Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. Diabetes Care* 23: 1516-1526.

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.

Kelley KW, Arkins S, Li YM. (1992) Growth hormone, prolactin, and insulin-like growth factors: new jobs for old players. *Brain Behav Immun.* 6(4):317-26.

Kelly PA, Posner BI, Tsushima T, Friesen HG (1973) Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: ontogenesis, effects of sex and pregnancy. *Endocrinology* 95: 532-539.

Kelly PA, Ali S, Rozakis M, Goujon L, Nagano M, Pellegrini I, Could D, Edery M, Finidori J, Postel-Vinay MC (1993) The growth hormone/prolactin receptor family. *Recent Prog Horm Res* 48: 123-164.

Kjelsberg MA, Cotecchia S, Ostrowski J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) Constitutive activation of the $\alpha 1B$ -adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. *J Biol Chem.* 267:1430-1433.

Koenig RJ, Brent GA, Warne RL, Larsen PR, Moore DM (1987) Thyroid hormone receptor binds to a site in the rat growth hormone promoter required for induction by thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci* 84: 5670-5674.

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuro H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.

Kowlakowski LF (1994) CGRDb: a G-protein-linked receptor database. *Receptor and Channels* 2: 1-7.

Konturek SJ, Brzozowski T, Dembinski A, Warzecha Z, Konturek PK, Yanaihara N (1988). Interaction of growth hormone-releasing factor and somatostatin on ulcer healing and mucosal growth in rats: role of gastrin and epidermal growth factor. *Digestion* 41 : 121-128.

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.

Korytko AI, Cuttler L (1997) Thyroid hormone and glucocorticoid regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression. *J Endocrinol* 152:R13-R17.

Kovacs M, Schally AV, Lee EJ, Busto R, Armatis P, Groot K, Varga JL (2002) Inhibitory effects of antagonistic analogs of GHRH on GH3 pituitary cells overexpressing the human GHRH receptor. *J. Endocrinol.* 175 : 425-434.

Knobil E, Hotchkiss J (1964) Growth hormone. *A. Rev Physiol* 26: 47-74.

Krolewski AS, Warram JH, Christlieb AR, Busik EJ, Kahn DR (1985) The changing natural history of nephropathy in type I diabetes. *Am J Med* 78:785-794.

Laburthe M, Couvineau A, Gaudin P, Maoret JJ, Rouyer-Fessard C, Nicole P (1996) Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagons, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor. *Ann NY Acad Sci* 805:94-109.

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.

Lang I, Schemthaler G, Pietschmann P, Kurz R, Stephenson JM, Templ H (1987) Effects of sex and age on growth hormone response to growth hormone-releasing hormone in healthy individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 535-540.

Lapierre H, Pelletier G, Petitclerc D, Dubreuil P, Morisset J, Gaudreau P, Couture Y, Brazeau P (1988) Effect of human growth hormone (GH) release and milk production in dairy cows. *J Dairy Sci* 71:92-98.

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.

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.

Le Cam A, Legraverend C (1993) Mode d'action de l'hormone de croissance. *Med Sci* 9 : 1352-1361.

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.

Lefrançois L, Gaudreau P (1994) Identification of receptor-binding pharmacophores of growth hormone-releasing factor in rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 59: 363-370.

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.

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.

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.

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.

Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Hammonds RG, Collins C, Henzel WJ, Barnard R, Waters MJ, Wood WI (1987) Growth hormone receptor and serum binding protein : purification, cloning and expression. *Nature* 330 : 537-543.

Lewis UJ, Dunn JT, Bonewald LF, Seavey BK, and VanderLaan WP (1978) A naturally occurring variant of human growth hormone. *J Biol Chem* 253: 2679-2687.

Lewis UJ, Markoff E, Culler FL, Hayek A, Vanderlaan WP. 1987 Biologic properties of the 20K-Dalton variant of human growth hormone: a review. *Endocrine Journal* 34 (Suppl 1): 73-85.

Lewis BM, Dieguez C, Ham J, Page MD, Creagh FM, Peters JR, Scanlon MF (1989) Effects of glucose on thyrotropin releasing hormone, somatostatin and luteinizing hormone releasing hormone release from rat hypothalamus. *J Neuroendocrinology* 1:437-441.

Lewis UJ, Lewis LJ, Salem MA, Staten NR, Galosy SS, Krivi GG (1991) A recombinant-DNA-derived modification of human growth hormone (hGH44-191) with enhanced diabetogenic activity. *Mol Cell Endocrinol* 78: 45-54.

Lewis BM, Ismail IS, Issa B, Peters JR, Scanlon MF (1996) Desensitisation of somatostatine, TRH and GHRH responses to glucose in the diabetic (Goto-Kakizaki) rat hypothalamus. *J Endocrinol* 151: 13-17.

Li CH, Evans HM, Simpson ME (1945) Isolation and properties of the anterior hypophysial growth hormone. *J Biol Chem* 159: 353-356.

Liang L, Jiang J, Frank SJ (2000) Insulin receptor substrate-1-mediated enhancement of growth hormone-induced mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 141: 3328-3336.

Lin HY, Harris TL, Flannery MS, Aruffo A, Kaji EH, Gorn A, Kolakowski LJ, Lodish HF, Goldring SR (1991) Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science* 254:1022-1024.

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.

Lin SC, Lin CR, Gukovsky I, Lusic AJ, Sawchenko PE, Rosenfield MG (1993) Molecular basis of the little mouse phenotype and implication for cell type-specific growth. *Nature* 364: 208-213.

Ling N, Baird A, Wehrenberg WB, Ueno N, Munegumi T, Chiang TC, Regno M, Brazeau P. (1984) Synthesis and in vitro bioactivity of human growth hormone-

releasing factor analogs substituted in position 1. *Biochem Biophys Res Commun* 122:304–12.

Ling N, Zeytin F, Bohlen P, Esch F, Brazeau P, Wehrenberg WB, Baird A, Guillemin R (1985) Growth hormone releasing factors. *Annu Rev Biochem* 54: 403-423.

Locatelli V, Rovati S, Miyoshi H, Muller EE (1984) Growth hormone hyperresponsiveness to human pancreatic growth hormone releasing hormone in streptozotocin-diabetic rats. *Horm Metab Res* 16:507.

Locatelli V, Miyoshi H, Bestetti G, Rossi GL, Muller EE (1985) Effect of growth hormone-releasing stimuli in streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res* 341:35.

Lonn L, Johansson G, Sjoström L, Kvist H, Oden A, Bengtsson BA (1996) Body composition and tissue distributions in growth hormone deficient adults before and after growth hormone treatment. *Obes Res* 4: 45-54.

Lopes MBS, Gayhnn BD, Thomer MO, Stoler MH (1997) Growth-hormone-releasing hormone receptor mRNA in acromegalic pituitary tumors. *Am J Pathol* 150:1885-1891.

Lumpkin MD, McDonald JK (1989) Blockade of growth hormone releasing-factor activity in the pituitary and hypothalamus of the conscious rat with a peptidic GHRH antagonist. *Endocrinology* 124:1522–31

Lussier BT, French MB, Moor BC, Kraicer J (1991) Free intracellular Ca²⁺ concentration and growth hormone (GH) release from purified rat somatotrophs. III. Mechanism of action of GH-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 128:592-603.

Lussier BT, French MB, Moore BC, Kraicer J (1991) Free intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) and growth hormone release from purified rat somatotrophs. I. GH-releasing factor-induced Ca²⁺ influx raises [Ca²⁺]_i. *Endocrinology* 128:570-582.

Maccario M, Grottoli S, Procopio M, Oleandri SE, Rosetto R, Gauna C, Arvat E, Ghigo E (2000) The gH/IGF-I axis in obesity: influence of neuroendocrine and metabolic factors. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2:S96-S99.

Maget B, Tastenoy M, Svoboda M (1994) Sequencing of eleven introns in genomic DNA encoding rat glucagon receptor and multiple alternative splicing of its mRNA. *FEBS Lett* 351: 271-275.

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.

Makino H, Hanatsuka A, Matsushima Y, Yamamoto M, Kumagai A, Yanaihara N (1977) Effect of streptozotocin administration on somatostatin content of pancreas and hypothalamus in rats. *Endocrinologia Japonica* 24:295-299.

Marcinkowski W, Zhang G, Smogorzewski M, Massry SG (1997) Elevation of $[Ca^{2+}]_i$ of renal proximal tubular cells and down-regulation of mRNA of PTH-PTHrP, V1a and AT1 receptors in kidney of diabetic rats. *Kidney Int* 51: 1950-1955.

Margioris AN, Brockmann G, Bohler Jr HC, 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.

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.

Masuda A, Shibasaki T, Nakahara M, Imaki T, Kiyosawa Y, Jibiki K, Demura H, Shizume K, Ling N (1985) The effect of glucose on growth hormone (GH) releasing hormone-mediated GH secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab* 60: 523-526.

Mathews LS, Norstedt G, Palmiter RD (1986) Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9343-9347.

Mathews LS, Enberg B, Nordstedt G (1989) Regulation of rat growth hormone receptor gene expression. *J Biol Chem* 264:9905-9910.

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.

Mayo KE, Cerelli GM, Rosenfeld MG, Evans RM (1985a) Characterization of cDNA and genomic clones encoding the precursor to rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature* 314: 464-467.

Mayo KE, Cerelli GM, Lebo RV, Bruce BD, Rosenfeld MG, Evans RM (1985b) Gene encoding human growth hormone-releasing factor precursor: structure, sequence, and chromosomal assignment. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 63-67.

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.

Mayo KE (1992) Molecular cloning and expression of a pituitary specific receptor for growth hormone-releasing factor. *Mol Endocrinol* 6: 1734-1744.

Mayo KE, Godfrey PA, Suhr ST, Kulik DJ, Rahal JO (1995) Growth hormone-releasing hormone: synthesis and signaling. In: *Recent progress in Hormone Research*, Bardin Ed, Academic Press 50:35-73.

Mayo KE, Miller TL, DeAlmeida V, Zheng J, Godfrey PA (1996a) The growth-hormone-releasing hormone receptor: signal transduction, gene expression, and physiological function in growth regulation. *Ann NY Acad Sci* 805: 184-203.

Mayo KE, Godfrey PA, DeAlmeida V, Miller, T. (1996b) Structure, function, and regulation of the pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. In: Bercu BB, Walker RF, editors. *Growth hormone secre-tagogues*. New York: Springer-Verlag, 1996. pp. 53-71.

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.

Merimee TJ, Gardner DF, Zapf J, Froesch ER (1984) Effect of glycemic control on serum insulin-like growth factors in diabetes mellitus. *Diabetes* 33:790-793.

Merimee TJ, Hewlett BS, Wood W, Bowcock AM, Cavalli-Sforza LL (1989) The growth hormone receptor gene in the African pygmy. *Trans Assoc Am Physicians* 102: 163-169.

Miller T, Mayo K (1997) Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 138: 2458-2465.

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 signalling properties. *Endocrinology* 140:4152-4165.

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.

Miki N, Ono M, Murata Y, 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 Comm* 217:1087- 1093.

Miki N, Ono M, Murata Y, Ohsaki F, 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.

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* 5:475-484.

Momany FA, Bowers CY,(1996) Speculations on the mechanism of hormone-receptor interactions of the secretin/glucagons family of polypeptide hormones derived from computational structural studies. *Ann NY Acad Sci* 805:172-181.

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.

Moretti C, Bagnato A, Solan N, Frajese G, Catt K (1990) receptor-mediated actions of growth hormone-releasing factor on granulose cell differentiation. *Endocrinology* 127: 2117-2126.

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.

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.

Müller EE, Rolla M, Ghigo E, Belliti D, Arvat E, Andreoni A, Torsello A, Locatelli V, Camanni F (1995) Involvement of brain catecholamines and acetylcholine in growth hormone hypersecretory states. Pathophysiological, diagnostic and therapeutic implications. *Drugs* 50: 805-837.

Muraio K, Sato M, Mizobuchi M, Niimi M, Ishida T, Takahara J (1994) Acute effects of hypoglycemia and hyperglycemia on hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin gene expression in the rat. *Endocrinology* 134:418-423.

Nakagawa K, Ishizuka T, Matsubara M, Akikawa K (1987) Dichotomic action of glucocorticoids on growth hormone secretion. *Acta Endocrinol (Copenh)* 116:165-171.

Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409: 194-198.

Ndon JA, Giustina A, Wehrenberg WB (1992) Hypothalamic regulation of impaired growth hormone secretion in diabetic rats. *Neuroendocrinology* 55 : 500-505.

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.

Niall HD, Hogan ML, Sauer IY, Rosenblum IY, Greenwood FC (1971) Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc Nat Acad Sci USA* 68: 866-869.

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

Obál F Jr, Payne L, Kapás L, Opp M, Krueger JM (1991) Inhibition of growth hormone-releasing factor suppressed both sleep and growth hormone secretion in the rat. *Brain Res* 557: 149-153.

Obál, F. Jr, Fang, J., Taishi, P., Kacsoh, B., Gardi, J., Krueger, J.M. (2001) Deficiency of growth hormone-releasing hormone signaling is associated with sleep alterations in the dwarf rat. *J. Neurosci.* 21 : 2912-2918.

Ohlsson C, Bengtsson B, Isaksson OGP, Andreassen TT, Słotweg MC (1998) Growth hormone and bone. *Endocrine Reviews* 19: 55-79.

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 : 728-737.

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. *Endocrinology* 126:53-61.

Olchovsky D, Bruno JF, Gelato MC, Song J, Berelowitz M (1991) Pituitary insulin-like growth factor-I content and gene expression in the streptozotocine-diabetic rat: evidence for tissue-specific regulation. *Endocrinology* 128: 923-928.

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.

OMS (Organisation mondiale de la santé):

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/>

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.

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.

Osterby R, Gundersen HJ (1975) Glomerular size and structure in diabetes mellitus. I. Early abnormalities. *Diabetologia* 11: 225-229.

Paek I, Axel R (1987) Glucocorticoids enhance stability of human growth hormone mRNA. *Mol Cell Biol* 7:1496-1507.

Pal BR, Mathews DR, Edge JA, Mullis PE, Hindmarsh PC, Dunger DB (1993) The frequency and amplitude of growth hormone secretory episodes as determined by deconvolution analysis are increased in adolescents with insulin dependent mellitus and are unaffected by short-term euglycaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 38:93-100.

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.

Parker DC, Sassin JF, Mace JW, Rossman L (1969) Human growth hormone release during sleep: electroencephalographic correlation. *J Clin Endocrinol Metab* 29: 87-874.

Parker DC, Rossman LG (1971) Human growth hormone release in sleep: nonsuppression by acute hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 32:65-69.

Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, Dumont J, Vassart G (1993) Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature* 365 :649-651.

Pascual M, Larralde J, Martinez JA (1995) Insulin-like growth factor I (IGF-I) affects plasma lipid profile and inhibits the lipolytic action of growth hormone (GH) in isolated adipocytes. *Life Sci.* 57: 1213-1218.

Patel YC, Cameron DP, Bankier A, Malaisse-Lagae F, Ravazzola M, Studer P, Orci L (1978) Changes in somatostatin concentration in pancreas and other tissues of streptozotocin diabetic rats. *Endocrinology* 103: 917-923.

Patel YC, Wheatley T, Zingg HH (1980) Increased blood somatostatin concentration in streptozotocin diabetic rats. *Life Sci* 27: 1563-1570.

Pellegrini-Bouiller I, Belicar P, Barlier A, Gunz G, Charvet JP, Jaquet P, Brue T, Vialettes B, Enjalbert A (1996) A new mutation of the gene encoding the transcription factor Pit-1 is responsible for combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2790-2796.

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* 127:233-242.

Pescovitz OH, Johnson NB, Berry SA (1991) Ontogeny of growth hormone releasing hormone and insulin-like growth factors-I and -II messengers RNA in rat placenta. *Pediatr Res* 29 :510-516.

Petersenn S, Rasch AC, Heyens M, Schulte HM (1998) Structure and regulation of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. *Molecular Endocrinology* 12:233-247.

Petersenn S, Schulte HM (2000) Structure and function of the growth-hormone-releasing hormone receptor. *Vitam Horm* 59: 35-69.

Phillips JA 3rd, Breamer WG, Bartke A (1982) Analysis of growth hormone genes in mice with genetic defects of growth hormone expression. *J Endocrinol* 92: 405-407.

Phillips 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.

Pisegna JR, Wank SA (1993) Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6345-6349.

Plotsky PM, Vale WW (1986) Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophyseal-portal circulation of the rat. *Science* 230:461-463.

Pombo CM, Zalvide J, Gaylinn BD, Dieguez C (2000) Growth hormone-releasing hormone stimulates mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 141:2113-2119.

Press M, Tamborlane WV, Thomer MO, Vale W, Rivier J, Gerther JM, Sherwin RS (1984a) Pituitary responses to growth hormone releasing factor in diabetes: failure of glucose-mediated suppression. *Diabetes* 33: 804-806.

Press M, Tamborlane WV, Sherwin R (1984b) Importance of raised growth hormone levels in mediating the metabolic derangements in diabetes. *N Engl J Med* 310:810-815.

Price GJ, Berka JL, Werther GA, Bach LA (1997) Cell-specific regulation of mRNAs for IGF-I and IGF-binding proteins-4 and -5 in streptozotocin-diabetic rat kidney. *J Mol Endocrinol* 18:5-14.

Rasch R (1984) Tubular lesions in streptozotocin-diabetics rats. *Diabetologia* 27:32-37.

Rasch R, Torffvit O, Bachmann S, Jensen PK, Jacobsen NO (1995) Tamm-Horsfall glycoprotein in streptozotocine diabetic rats: a study of kidney in situ hybridization, immunohistochemistry, and urinary excretion. *Diabetologia* 38: 525-535.

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 USA* 97:10561-10566.

Renier G, Gaudreau P, Deslauriers N, Petitclerc D, Brazeau P (1990) Dynamic of the GRF-induced GH in genetically obese Zucker rats: influence of central and peripheral factors. *Regul Pept* 28:95-106.

Renier G, Aribat T, Brazeau P, Deslauriers N, Gaudreau P (1990) Cellular mechanism of caprylic acid-induced growth hormone suppression. *Metabolism* 39: 1108-1112.

Richardson SB, Twente S (1987) Somatostatin release from dispersed hypothalamic cells: effects of diabetes. *Diabetologia* 30:893.

Riddell DC, Mallonee R, Phillips JA, Parks JS, Sexton LA, Hamerton JL (1985) Chromosomal assignment of human sequences encoding arginin vasopressin-neurophysin II and growth hormone releasing factor. *Somat Cell Mol Genet* 11: 189-195.

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.

Robinson ICAF, Clark RG, Carlsson LMS (1987) Insulin, IGF-I and growth in diabetics rats. *Nature* 326:549.

Rodgers CD, Noble EG, Taylor AW (1994) The effect of STZ-induced diabetes on serum triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) levels in the rat : a seven week time course. *Diabetes Res* 26: 93-100.

Rondeel JMM, de Greef WJ, Heide R, Visser TJ (1992a) Hypothalamo-hypophysial-thyroid axis in streptozotocin-induced diabetes. *Endocrinology* 130:216-220.

Rondeel JMM, Heide R, de Greef WJ, van Toor H, van Haasteren GAC, Klootwijk W, Visser TJ (1992b) Effetc of starvation and subsequent refeeding on thyroid function and release of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 56:348-353.

Rosenfeld PJ, Kelly TJ (1986) Purification of nuclear factor I by DNA recognition site affinity chromatography [published erratum appears in *J Biol Chem* 1986 Jul 25; 261(21) :10015] *J Biol Chem* 261:1398-1408.

Rudman D, Kutner MH, Rogers CM, Lubin MF, Fleming GA, Bain RP (1981) Impaired growth hormone secretion in the adult population. *J Clin Invest* 67:1361-1369.

Rudman D (1985) Growth hormone, body composition, and aging. *J Am Geriatrics Soc* 33: 800-807.

Santé Canada : http://www.hc-sc.gc.ca/hppb/marketing/social/yir-99-00_final-3/français/diabete_f.html

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.

Sartin JL, Coleman ES, Steele B (1996) Interaction of cyclic AMP- and calcium-dependent mechanisms in the regulation of growth hormone-releasing hormone-stimulated growth hormone release from ovine pituitary cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* 13 : 229-238.

Sato A, Shioda S, Nakai Y (1989) Catecholaminergic innervation of GRF-containing neurons in the rat hypothalamus revealed by electronmicroscopic cytochemistry. *Cell Tissue res* 257: 31-34.

Sato M, Frohman LA (1993) Differential effect 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.

Satozawa N, Takezawa K, Miwa T, Takahashi S, Hay-akawa M, Ooka H (2000) Differences in the effects of 20 K- and 22 K-hGH on water retention in rats. *Growth Horm IGF Res* 10: 187-192.

Sawchenko PE, Sawson 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.

Scheiwiller E, Guler HS, Merryweather J, Scandella C, Maerk W, Zapf J, Froesch ER (1986) Growth restoration of insulin-deficient diabetics rats by recombinant human insulin-like growth factor-I. *Nature* 323: 169-171.

Schwartz J, Kostyo JL (1981) Effects of cytochalasins on several actions of growth hormone on muscle metabolism. *Horm Metab Res* 13:343-347.

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: dependance on growth hormone status. *Endocrinology* 113: 297-305.

Segre GV, Golgring SR (1993) Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH),/PTH-related peptide, vasoactive intestinal peptide, glucagon-like peptide 1, growth hormone-releasing hormone and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family. *Trends Endocrinol Metab* 4:309 –314.

Seifert H, Perrin M, Rivier J, Vale W (1984) Binding sites for growth hormone releasing factor on rat anterior pituitary cells. *Nature* 313:487-489.

Seifert H, Perrin M, Rivier J, Vale W (1985) Growth hormone-releasing factor binding sites in anterior pituitary membrane homogenates: modulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 117: 424-426.

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.

Senaris RM, Lago F, Coya R, Pineda J, Dieguez C (1996) Regulation of hypothalamic somatostatine, growth hormone-releasing hormone, and growth hormone receptor messenger ribonucleic acid by glucocorticoids. *Endocrinology* 137:5236-5241.

Serri O, Brazeau P (1987) Growth hormone responsiveness in vivo and in vitro to growth hormone releasing factor in spontaneously diabetic BB Wistar rat. *Neuroendocrinology* 46:162.

Shetty KR, Duthie EH (1995) Anterior pituitary function and growth hormone use in the elderly. *Endocrinol Metab Clin North America* 24: 213-231.

Shibasaki T, Kiyosawa Y, Masuda A, Nakahara M, Imaki T, Wakabayashi I, Demura H, Shizume K, Ling N (1984) Distribution of growth hormone-releasing hormone like immunoreactivity in human tissue extracts. *J Clin Endocrinol Metab* 59: 23-268.

Shibasaki I, Yamauchi N, Hotta M, Masuda A, Imaki T, Demura H, Ling N, Shizume K (1986) In vitro release of growth hormone-releasing factor from rat hypothalamus: effect of insulin-like growth factor-1. *Regul Pept* 15: 47-53.

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.

Sonntag WE, Steger RW, Forman LJ, Meites J (1980) Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology* 107:1875-1879.

Sonntag WE, Lynch CD, Cefalu WT, Ingram RL, Bennett SA, Thornton PL, Khan AS (1999) Pleiotropic effects of growth hormone and insulin-like growth factor (IGF)-1 on biological aging: interferences from moderate caloric-restricted animals. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54A(12): B521-B538.

Spada A, Vallar L (1992) G-protein oncogenes in acromegaly. *Horm Res* 38: 90-93.

Spatola E, Peskovitch OH, Marsh K, Johnson NB, Berry SA, Gelato MC (1991) Interaction of growth hormone-releasing hormone with the insulin-like growth-factors during prenatal development in the rat. *Endocrinology* 129: 1193-1200.

Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L (1993) Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365: 170-175.

Srivastava CH, Collard MW, Rothrock JK, Peredo MJ, Berry SA, Pescovitz OH (1993a) Germ cell localization of a testicular growth hormone-releasing hormone-like factor. *Endocrinology* 133: 83-89.

Srivastava CH, Breyer PR, Rothrock JK, Peredo MJ, Pescovitz OH (1993b) A new target for growth hormone releasing-hormone action in rat: the Sertoli cell. *Endocrinology* 133: 1478-1481.

Stephan DJ, Blumer KJ. (1994) The third cytoplasmic loop of a yeast G-protein-coupled receptor controls pathway activation, ligand discrimination, and receptor internalization. *Mol Cell Biol.* 14:3339-3349.

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.

Styne DM (1991) The growth hormone secretory response to growth hormone releasing factor in the developing rhesus monkey. *J Med Primatol* 20:338-344.

Sugihara H, Emoto N, Tamura H, Kamegai J, Shibasaki T, Minami S, Wakabayashi I (1999) Effect of insulin-like growth factor-I on growth hormone-releasing factor receptor expression in primary rat anterior pituitary cell culture. *Neuroscience Letters* 276: 87-90.

Suhr ST, Rahal JO, Mayo (1989) Mouse growth-hormone-releasing hormone: precursor structure and expression in brain and placenta. *Mol Endocrinol* 3: 1693-1700.

Szabo M, Cuttler L (1986) Differential responsiveness of the somatotroph to growth hormone-releasing factor during early neonatal development in the rat. *Endocrinology* 118:69-73.

Takahashi S, Gottschall PE, Quigley KL, Goya RG, Meites J (1987) Growth hormone secretory pattern in young, middle-age and old female rats. *Neuroendocrinology* 46:137-142.

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.

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.

Tamaki 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.

Tang J, Lagacé G, Gastagné J, Collu R (1995) Identification of human growth hormone-releasing hormone receptor splicing variant. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 2381-2387.

Tannenbaum GS, Martin JB (1976) Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 98:562-570.

Tannenbaum GS (1981a) Growth hormone secretory dynamics in streptozotocin diabetes: evidence of a role for endogenous circulating somatostatin. *Endocrinology* 108:76-82

Tannenbaum GS, Colle E, Gurd W, Wanamaker L (1981b) Dynamic time-course studies of the spontaneously diabetic BB Wistar rat. I. Longitudinal profiles of plasma growth hormone, insulin, and glucose. *Endocrinology* 109:1872.

Tannenbaum GS, Epelbaum J, Bowers CY (2003) Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatine/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology* 144: 967-974.

Teh LC, Ormandy CJ, Surus AS, Sutherland RL, Chapman GE (1988) Human growth hormone binds to lactogenic receptors in bovine, ovine and rat adrenals. *Horm. Metab. Res.* 20: 278-281.

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.

Thorens B (1992) Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the glucose-incretin hormone glucagons-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8641-8645.

Uchida H, Naito N, Asada N, Wada M, Ikeda M, Kobayashi H, Asanagi M, Mori K, Fujita Y, Konda K, Kusahara N, Kamioka T, Nakashima K, and Honjo M (1997) Secretion of authentic 20-kDa human growth hormone (20K hGH) in *Esche-richia coli* and properties of the purified product. *J Biotech* 55: 101–112, .

Umpleby AM, Russell-Jones DL (1996) The hormonal control of protein metabolism. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 10: 551-570.

Unson CG, Cypess AM, Kim HN, Goldsmith PK, Carruthers CJ, Merrifield RB, Sakmar TP (1995) Characterization of deletion and truncation mutants of the rat glucagon receptor transport to the plasma membrane and glucagons binding. *J Biol Chem* 270: 27720-27727.

Uzdin TB, Mezey E, Button DC, Browstein 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.

Vaccarino FJ, Feifel D, Rivier J, Vale W, Kooe GF (1986) Centrally administered hypothalamic growth hormone-releasing factor stimulated food intake in free-feeding rats. *Peptides* 9:35-38.

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.

Van Cauter E, Caufriez A, Kerkhofs M, Van Onder-Bergen A, Thorner MO, Copinschi G. (1992) Sleep, awakenings, and insulin-like growth factor-I modulate the growth hormone (GH) secretory response to GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 1451-1459.

Vandepol CJ, Leidy JW Jr, Finger TE, Robbins RJ (1986) The hypothalamo-infundibular growth hormone-releasing hormone (GHRH) system of the rat. *Brain Res* 378: 297-302.

Velicelebi G, Santacrose TM, Harpold MH (1985) Specific binding of synthetic human pancreatic growth hormone-releasing factor (1-40-OH) to bovine pituitaries. *Biochem Biophys Res Commun* 126:33-39.

Velicelebi G, Patthi S, Povow S, Akong M (1986) Covalent crosslinking of growth hormone-releasing factor to pituitary receptors. *Endocrinology* 118: 1278-1283.

Vertongen P, Velkeniers B, Hooghe-Peters E, Robberecht P. (1995) Differential alternative splicing of PACAP receptor in pituitary cell subpopulations. *Mol cell Endocrinol* 113: 131-135.

Veyrat-Durebex C, Gaudreau P, Boghossian S, Alliot J (2001) Effect of peripheral and central administration of GHRH on feeding in aging LOU rats. *Peptides* 22: 2119-2126.

Veyrat-Durebex C, Pomerleau L, Langlois D, Gaudreau P (2004) Internalization and trafficking of the human and rat growth hormone-releasing hormone receptor. *J Cell Physiol* 21 oct (Epub ahead of print)

Vogl C, Atchley WR, Cowley DE, Crenshaw P, Murray JD, Pomp D (1993) The epigenetic of growth hormone on skeletal development. *Growth Dev Aging* 57: 163-182.

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.

Wehrenberg WB (1986a) The role of growth hormone-releasing factor and somatostatin on somatic growth in rats. *Endocrinology* 118: 489-494.

Wehrenberg WB, Seifert J, Bilezikjian LM, Vale W (1986b) Down-regulation of growth hormone releasing factor receptors following continuous infusion of growth hormone releasing factor in vivo. *Neuroendocrinology* 43:266-28

Welsh JB, Szabo M (1988) Impaired suppression of growth hormone release by somatostatin in cultured adenohypophyseal cells of spontaneously diabetic BB/W rats. *Endocrinology* 123:2230.

Werner H, Shen-Orr Z, Stannard B, Burguera B, Roberts CT, Jr., LeRoith D (1990) Experimental diabetes increases insulin-like growth factor I and II receptor concentration and gene expression in kidney. *Diabetes* 39:1490-1497

West CR, Lookingland KJ, Tucker HA (1997) Regulation of growth hormone-releasing hormone and somatostatin from perfused, bovine hypothalamic slices. III. Reciprocal feedback between growth hormone-releasing hormone and somatostatin. *Domest. Anim. Endocrinol.* 14 : 358-366.

Winer LM, Shaw MA, Bauman G (1990) Basal plasma growth hormone levels in man: new evidence for rhythmicity of growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 1678-1686.

Winter RJ, Phillips LS, Klein MN, Traisman HS, Green OC (1979) Somatomedin activity and diabetic control in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 45:236-239.

Yaqoob M, McClelland P, Patrick AW, Stevenson A, Mason H, White MC, Bell GM. (1994) Evidence of oxidant injury and tubular damage in early diabetic nephropathy. *QJM* 87: 601-607.

Yamashita S, Weiss M, Melmed S (1986) Insulin-like growth factor I regulates growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels in human pituitary tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab* 63: 73-735.

Yamashita S, Melmed (1987) Insulin-like growth factor I regulation of growth hormone gene transcription. *J Clin Invest* 79:449-452.

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.

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

Zeitler P, Siriwardana G (2000) Stimulation of mitogenic-activated protein kinase pathway in rat somatotrophs by growth hormone-releasing hormone. *Endocrine* 12: 257-264.

Zhang J, Obàl F. Jr., Zheng T, Fang J, Taishi P, Krueger JM (1999) Intraoperative microinjection of GHRH or its antagonist alters sleep in rats. *J Neurosci* 19: 2187-2194.

Zimber A, Nguyen QD, Gespach C (2004) Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease. *Cell signaling* 16: 1085-1104.

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.

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.

7. ANNEXE 2

CONTRIBUTIONS ORIGINALES

ARTICLES

- 1) Boulanger L, N Girard, **J Strecko** and P Gaudreau. Characterization of a growth hormone-releasing hormone binding site in the rat renal medulla. *Peptides*, 23, 43-50, 2002.
- 2) **Strecko J**, Veyrat-Durebex C, Hoa S, Boisvert C, Gaudreau P. Regulation of pituitary and renal growth hormone-releasing hormone receptor in streptozotocine-diabetic rats. *J Cell Physiol*, soumis 2005.
- 3) **Boisvert C**, Veyrat-Durebex C, Strecko J, Gaudreau P. 2005 Cellular localization of the growth hormone-releasing hormone receptor in the loop of Henle and tissue-specific regulation by high dietary salt intake. *Endocrinology*, en préparation.
- 4) **Strecko J**, Gaudreau P. Développement d'une technique de radiolisation au GHRH dans les cellules d'anse de Henlé mince. Soumission à venir.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

- 1) Bédard K, **Strecko J**, Veyrat-Durebex C, Farrajota K, Gaudreau P. Chronic hyperglycemia regulate the pituitary growth hormone releasing hormone receptor. *Peptide Receptors 2004 International Symposium: from gene to therapy*, Montréal, 31 juillet au 4 août 2004.
- 2) **Strecko J**, Boisvert C, Robert A, Gaudreau P. Régulation du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat diabétique de type I : un modèle de somatopause accélérée? *Première Journée Scientifique du Réseau Géroto-Gériatrie du FRSQ*, McGill University, 26 avril 2002.

- 3) **Strecko J**, Boisvert C, Robert A, Gaudreau P. Régulation tissu spécifique des niveaux d'ARNm du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance dans l'hypophyse et la médulla rénale chez le rat diabétique. Troisième congrès des étudiants stagiaires de recherche de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal, 26 janvier 2002.
- 4) **Strecko J**, Boisvert C, Robert A, Gaudreau P. Régulation tissu spécifique des niveaux d'ARNm du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance dans l'hypophyse et la médulla rénale chez le rat diabétique. Quatrième journée scientifique des étudiants et stagiaires du CHUM, 20 décembre 2001.
- 5) Boisvert C, Veyrat-Durebex C, Paré C, **Strecko J**, Gaudreau P. Régulation du récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance : effet d'une diète riche en NaCl et d'une restriction hydrique. Quatrième journée scientifique des étudiants et stagiaires du CHUM, 20 décembre 2001.
- 6) **Strecko J**, Boisvert C, Robert A, Gaudreau P. Régulation tissu spécifique des niveaux d'ARNm du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance dans l'hypophyse et la médulla rénale de rat diabétique. Présentation sur invitation. Congrès annuel de l'Association du Diabète Québec, Québec, 9-10 novembre 2001.
- 7) Boisvert C, Veyrat-Durebex C, Paré C, **Strecko J**, Gaudreau P. Localization and induction by high dietary salt intake of renal growth hormone-releasing hormone receptor in the loop of Henle. Peptide Receptors 2001 International Symposium: from gene to therapy, Montréal, 29 juillet au 2 août 2001.